

STRUKTURCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN UNTEREINHEITEN DES HÄMOCYANINS
DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Peter Nahke

1984

**STRUKTURCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN UNTEREINHEITEN DES HÄMOCYANINS
DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Peter Nahke
aus Hamburg

München

1984

Tag der Abgabe: 17.02.84

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Linzen

2. Gutachter: Prof. Dr. E. L. Winnacker

Datum der mündlichen Prüfung: 26.07.84

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft, seine Anregungen zur Arbeit und seine Geduld bei der Abfassung des Manuskripts.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans-Jürgen Schneider für seine kollegiale, freundschaftliche Zusammenarbeit und sein reges Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Paur aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Gollnick, Institut für Organische Chemie der Universität München, der mir bei der Durchführung der Photooxidationsversuche behilflich war.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die Gesprächsbereitschaft, für die offenen Diskussionen und die freundschaftliche Atmosphäre.

Mein Dank gilt auch Frau K. Rusch für den Satz des Manuskripts und Frau K. Heckel für die Anfertigung der Abb. 1.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINLEITUNG	1
B	MATERIAL UND METHODEN	8
1	Chemikalien	8
2	Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung	9
3	Isolierung der Untereinheiten	9
4	Proteinbestimmung und UV-Spektroskopie	10
5	Dialyse	10
6	Konzentrierungsmethoden	10
7	Analytische Ultrazentrifugation	11
8	Sauerstoffbindungskurven	11
9	Kupferbestimmung	11
10	Darstellung von apo-Hämocyanin	12
11	Aminosäureanalyse	12
12	N-terminale Aminosäurebestimmung und Sequenzierung	13
13	Proteinmodifikation	13
	a) Mercaptolyse und Carboxymethylierung der SH-Gruppen	13
	b) Oxidation mit Perameisensäure	14
	c) Blockierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins mit ETPA	14
14	Chemische Proteinspaltung	16
	a) Bromcyanspaltung	16
	b) Säurespaltung	16
	c) Spaltung mit o-Jodosobenzoesäure	16
15	Enzymatische Proteinspaltung	17
	a) Trypsinolyse	17
	b) Spaltung mit Chymotrypsin	17
	c) Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease	17
	d) Proteolyse mit Subtilisin	18
16	Gelfiltration	18
17	Ionenaustauschchromatographie	19
	a) Isolierung der Untereinheiten	19
	b) Trennung von Peptiden	20

18	Chromatofokussierung	20
19	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	21
20	Fingerprints	21
21	Elektrophoresen	22
	a) Analytische Plattengelelektrophorese (PAGE)	22
	b) Analytische SDS-PAGE	22
	c) Zweidimensionale Immunelektrophorese	23
	d) Anfärben der Gele	23
	e) MG-Bestimmung mit der SDS-PAGE	23
C	ERGEBNISSE	24
1	Zur Isolierung der Untereinheiten	24
1.1	Isolierung der Untereinheit f	24
1.2	Nachreinigung der Untereinheit f durch Ionenaustauschchromatographie	25
1.3	Versuche zur Isolierung der Untereinheit f aus dem Monomeren- bzw. Dimerengemisch durch Ionenaustauschchromatographie	27
1.4	Isolierung der Untereinheit b und c	33
1.5	Isolierung der Untereinheit g	37
2	Chemische und enzymatische Spaltungen der Untereinheit f	38
2.1	Die Bromcyanspaltung der Kette f	38
2.2	Die unspezifische Säurespaltung	51
2.3	Enzymatische Spaltungen der Untereinheit f	51
3	Kupferbestimmung hämocyandinhaltiger Lösungen	55
3.1	Kupferverlust bei der Isolierung des Hämocyansins	55
3.2	Der Kupfergehalt von Hämocyaninlösungen nach Einwirkung denaturierender Agenzien	60
3.3	Darstellung von apo-Hämocyanin	66
3.4	Das UV-Spektrum von apo-Hc	69
4	Zur Struktur des aktiven Zentrums von Eurypelma-Hämocyanin	72
4.1	Isolierung kupferhaltiger Peptide	73
4.2	Die Photooxidation des Hämocyansins zur spezifischen Modifikation der kupferbindenden Histidine	75

4.3	Isolierung und Sequenzierung des "His/Trp-reichen Peptids" nach Photooxidation der Untereinheit a	83
5	Aminosäuresequenzen tryptischer Peptide der Untereinheit a; Vergleich mit Sequenzabschnitten anderer Untereinheiten von Arthropoden-Hämocyanin	86
D	DISKUSSION	
1	Die Isolierung der Untereinheit f, b und c Zum $f_2 \rightleftharpoons 2f$ -Gleichgewicht	89
2	Chemische und enzymatische Spaltungen der Untereinheit f	95
3	Tyrosin als endogener Cu(II)-Cu(II)-Brücken-Ligand im aktiven Zentrum des Eurypelma-Hämocyanins	97
4	Die Identifizierung kupferbindender Histidine	98
5	Das aktive Zentrum des Arthropoden-Hämocyanins - eine Hypothese	99
E	ZUSAMMENFASSUNG	101
F	LITERATURVERZEICHNIS	103

ABKÜRZUNGEN

a-Hc	Arthropoden-Hämocyanin
apo-Hc	kupferfreies Hämocyanin
CM-	Carboxymethyl-
DABITC	4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat
DABTH	4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-thiohydantoin
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNP-	Dinitrophenyl-
ETPA	Exo-cis-3,6-endoxo- Δ^4 -tetrahydrophthalsäure-anhydrid
Hc	Hämocyanin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I	Ionenstärke
IEP	Isoelektrischer Punkt
MG	Molekulargewicht
m-Hc	Mollusken-Hämocyanin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PTH	Phenylthiohydantoin
QAE-	Quartäres Aminoäthyl-
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TPCK	L-(1-Tosylamido-2-phenyl)ethylchloromethylketon

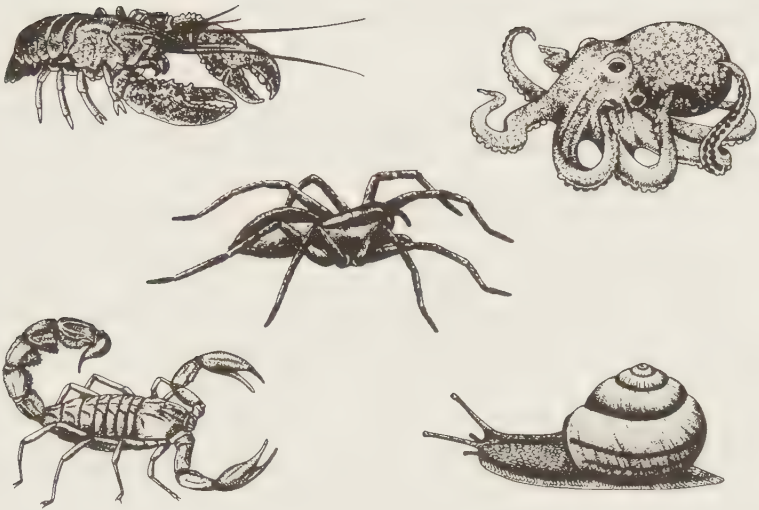


Abb. 1a: Tintenfische, Schnecken (Mollusken) und Krebse, Spinnen, Skorpione (Arthropoden) besitzen als respiratorisches Pigment Hämocyanin.

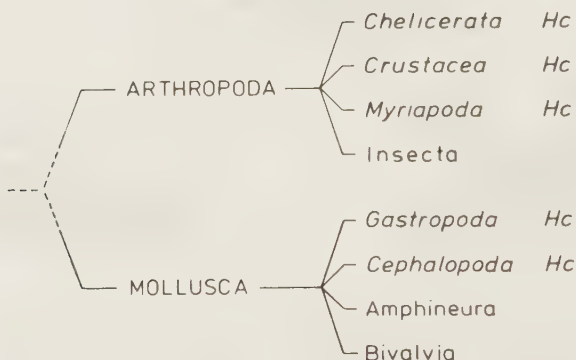
A EINLEITUNG

Sauerstoff wird im Körper höherer Tiere hauptsächlich durch reversible Bindung an Metalloproteine transportiert. Als Atmungspigmente einer großen Anzahl von Arthropoden und Mollusken wurden die kupferhaltigen Hämocyanine nachgewiesen (Abb. 1a und 1b). So ist die Blaufärbung der Hämolymphe von Tintenfischen, Schnecken, Krebsen, Skorpionen, Spinnen auf das Hämocyanin zurückzuführen, das extrazellulär in der Körperflüssigkeit dieser Invertebraten vorliegt. Die Bezeichnung "Hämocyanin" ist erstmals bei FREDERICQ (1878) zu finden.

An der Aufklärung der Struktur und Funktion der Hämocyanine wird seit Jahrzehnten intensiv gearbeitet (Zusammenfassungen: REDFIELD, 1934; VAN HOLDE und VAN BRUGGEN, 1971; LONTIE und WITTERS, 1973; BONAVENTURA et al., 1975; MANGUM, 1980; SOLOMON, 1982; VAN HOLDE und MILLER, 1982), mehrere Sym-

posia wurden über die "Atmungspigmente der Invertebraten" veranstaltet (GHIRETTI, 1968; BANNISTER, 1977; LAMY und LAMY, 1981; WOOD, 1983).

Abb. 1b: Systematische Stellung der Tierarten, die Hämocyanin als Atmungspigment besitzen (modifiziert nach VAN HOLDE und MILLER, 1982).



Gemeinsame Eigenschaften aller Hämocyanine sind:

(1) es sind hochmolekulare oligomere Proteine; (2) 1 Molekül Sauerstoff wird von 2 Kupferionen gebunden; (3) deoxygeniertes Hämocyanin ist farblos, oxygeniertes Hämocyanin dagegen blau; das Absorptionsspektrum der sauerstoffbeladenen Hämocyanine zeigt neben der typischen Proteinbande bei 280 nm zwei weitere Absorptionsmaxima bei ca. 340 und 570 nm.

Sind für alle bisher untersuchten Hämocyanine (Hc) diese drei Punkte charakteristisch, so unterscheiden sich die Hämocyanine der Mollusken (m-Hc) und der Arthropoden (a-Hc) in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur so grundlegend voneinander, daß heute eine konvergente Entwicklung dieser beiden Hc-Typen diskutiert wird (VAN HOLDE, 1983).

Mollusken-Hämocyanine werden von Untereinheiten mit Molekulargewichten um 400.000 aufgebaut. Jeder der Untereinheiten enthält 8 aktive Zentren, die in 8 Domänen über die Polypeptidkette verteilt sind (2 Cu/50.000 Dalton). Bei den Cephalopoden bilden 10 dieser Untereinheiten zylinderförmige Oligomere, die mit 60 S sedimentieren. Bei den Gastropoden kommt es durch Assoziation von 20 Untereinheiten zur Ausbildung von 100 S-Oligomeren, diese enthalten 160 Sauerstoffbindungsstellen.

Die Untereinheiten der Arthropoden-Hämocyanine dagegen sind wesentlich kleiner, ihre Molmasse liegt um 75.000 Dalton. Eine Untereinheit als kleinste funktionelle Einheit enthält 2 Cu-Atome (2 Cu/75.000 Dalton, entsprechend einem Kupfergehalt von ca. 0.17 %). Sechs dieser Untereinheiten bilden trigonal antiprismatische Hexamere als physiologische Grundbausteine der Quartärstruktur der a-Hc: artspezifisch lassen sich in vivo (1x6)-, (2x6)-, (4x6)- und (8x6)-Oligomere isolieren, die mit 16 S, 25 S, 37 S und 62 S sedimentieren (Abb. 2).

Der entscheidende Durchbruch zum Verständnis der Quartärstruktur der Arthropoden-Hämocyanine gelang mit dem Nachweis der Heterogenität der Untereinheiten, den erstmals BUSSELEN (1970) bei *Carcinus maenas*-Hämocyanin führte. Bis heute sind sehr viele a-Hc auf die Heterogenität ihrer Untereinheiten analysiert worden (LINZEN, 1983, Review). Dabei konnte gezeigt werden, daß (1) alle untersuchten a-Hc aus heterogenen Untereinheiten aufgebaut sind, (2) die Anzahl der immunologisch nicht miteinander kreuzreagierenden Untereinheiten kleiner, seltener gleich der elektrophoretisch bestimmten Anzahl der Untereinheiten ist (MARKL und KEMPTER, 1981), (3) bei einigen a-Hc im Dissoziat Dimere nachweisbar sind; dabei kann die Dimerenbildung auf kovalente Verknüpfung der Untereinheiten über Disulfidbrücken als auch auf nichtkovalente Bindungen zurückgeführt werden; die Dimere können von identischen (Homodimere) oder von verschiedenen (Heterodimere) Untereinheiten gebildet werden (MARKL et al., 1981). Ein Vergleich der bisher publizierten Daten (MARKL et al., 1979a; MARKL et al., 1979b) deutet auf eine Korrelation zwischen der Größe des nativen Oligomers und der Anzahl verschiedener Untereinheiten hin: je größer das Oligomer, umso ausgeprägter die Heterogenität.

Abb. 2: Bauprinzip der Quartärstruktur von Arthropoden-Hämocyanin; Klassifizierung der S-Werte nach VAN HOLDE und MILLER (1982). Beim Vergleich gleichgroßer Moleküle kann der S-Wert von Tierart zu Tierart stark variieren: so sedimentiert die (1x6)-Einheit von *Androctonus australis* mit 19.4 S, die von *Cancer magister* mit 18.0 S und von *Cupiennius salei* mit 15.9 S.

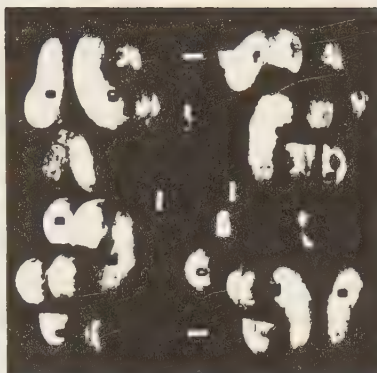
HÄMOCYANIN	Struktur		S-Wert	Vorkommen
Hexamer	1X6		16S	z.B. Languste
Dodekamer	2X6		25S	z.B. Wolfsspinne
24-mer	4X6		37S	z.B. Vogelspinne
48-mer	8X6		62S	z.B. Pfeilschanzkreb

In der Hämolymphe der Vogelspinne *Eurypelma californicum* liegt das Hämocyanin als 24-mer (4 Hexamere, Abb. 2) vor, dessen Sedimentationskonstante zu 36.7 S bestimmt wurde (MARKL et al., 1976). 7 verschiedene Untereinheiten (a - g, in den Publikationen vor 1980 wurde Untereinheit g als c₂, Untereinheit c als c₄ und das Heterodimer bc als 4D bezeichnet) bauen das oligomere Protein auf (SCHNEIDER et al., 1977), wobei die Stöchiometrie der Untereinheiten im 37 S-Molekül konstant ist (MARKL et al., 1980; MARKL et al., 1981):

$$a:b:c:d:e:f:g = 4:2:2:4:4:4:4$$

Alle 7 Untereinheiten zeigen keine immunologische Kreuzreaktion untereinander (LAMY et al., 1979). Die Positionen der einzelnen Untereinheiten sind im 37 S-Molekül eindeutig festgelegt, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Antikörper-markierten Untereinheiten ergaben. Damit konnte die Quartärstruktur des 37 S-Moleküls aufgeklärt werden (MARKL et al., 1981; Abb. 3).

Abb. 3: Modell der Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (MARKL et al., 1981). Die weißen Balken deuten die Dimerenverknüpfung (Heterodimer b-c und Homodimer f-f) an.



Im Alkalischen läßt sich das 37 S-Hc vollständig in Monomere und Dimere dissoziieren, wobei die Untereinheiten a, d, e und g ausschließlich monomer, die Untereinheiten b und c nur als Heterodimer bc vorliegen. Untereinheit f dagegen ist die einzige der Untereinheiten, die nach alkalischer Dissoziation des 37 S-Hämocyanins sowohl im Monomeren- als auch im Dimerengemisch nachzuweisen ist: etwa ein Drittel der Untereinheit f liegt monomer, etwa zwei Drittel als Homodimer f_2 vor. Wird das Dimerengemisch aus bc und f_2 mit reduzierenden Agenzien wie Cystein versetzt, so wird nur das Homodimer f_2 in die Monomeren gespalten, ein eindeutiger Nachweis für die Beteiligung von Disulfidbrücken an der f-Dimerisierung. Da f_2 aber auch mit denaturierenden Agenzien allein in die Monomere überzuführen ist, wurde für die Dimerisierung der Untereinheit f folgende Hypothese aufgestellt: werden intramolekulare Disulfidbrücken der Untereinheit f reduziert, so wird dadurch eine Änderung der Tertiärstruktur induziert. Diese Konformationsänderung führt zum Aufbrechen der das Dimer stabilisierenden nichtkovalenten Bindungen (SCHNEIDER et al., 1977; SCHNEIDER, 1978; MARKL et al., 1981). Da das native 24-mer mit Cystein in zwei Dodekamere gespalten werden kann (SAVEL, persönliche Mitteilung), scheint die Dimerisierung der Untereinheit f für die Bildung und Stabilität des 37 S-Moleküls von entscheidender Bedeutung zu sein (Abb. 3).

Die Kenntnis der Primär- und Tertiärstruktur jeder der Untereinheiten ist die entscheidende Grundlage zum Verständnis der molekularen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten, die zur Ausbildung der in Aufbau und Größe streng definierten Quartärstruktur des 37 S-Moleküls führen und die physiologisch wichtige Kooperativität der Sauerstoffbindung des oligomeren Moleküls bewirken. Seit einigen Jahren wird in unserem Laboratorium an der proteinchemischen Analyse der Untereinheiten des Eurypelma californicum-Hämocyanins mit dem Ziel gearbeitet, die Primärstruktur aller 7 Polypeptidketten aufzuklären. So konnten MARKL et al. (1979) nachweisen, daß die Heterogenität der Untereinheiten auf Unterschiede in der Aminosäuresequenz zurückzuführen ist. Auch der geringe Kohlenhydratanteil der Untereinheiten scheint von Kette zu Kette qualitativ und quantitativ zu variieren (STRYCH, 1981). Die Sequenzanalysen der Polypeptidketten e (SCHNEIDER et al., 1983) und d (SCHARTAU et al., 1983) sind abgeschlossen. Beide Polypeptidketten zeigen eine Sequenzhomologie von 56 %.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die weitere proteinchemische Charakterisierung der Untereinheit f, der größten der Untereinheiten des Hämocyanins von Eurypelma californicum. Die Dimerisierung von f sollte untersucht werden, um einen Einblick in die Bedeutung der f-f Wechselwirkung für die Verknüpfung der beiden Dodekamere zum 24-mer des nativen Moleküls zu erlangen.

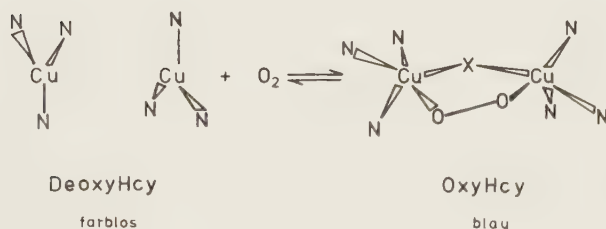
Bei den Arbeiten zur Aufklärung der Primärstruktur von Arthropoden-Hämocyanin konnte bei 6 Untereinheiten aus Hämocyaninen dreier Tierarten ein Peptid isoliert werden, das durch seinen außergewöhnlichen Sequenzabschnitt

-His-His-Trp-His-Trp-His-

charakterisiert ist und als eines der das Kupfer komplexierenden Peptide diskutiert wird (SCHNEIDER et al., 1982; RIGGS et al., 1983). Zwei Gründe sind für die Annahme, damit eines der das aktive Zentrum bildenden Peptidabschnitte sequenziert zu haben, maßgebend: (1) nach chemischen und spektroskopischen Untersuchungen an Hämocyaninen und metallorganischen Modell-

komplexen zur Aufklärung der Struktur und Funktion des aktiven Zentrums (SOLOMON, 1982, Review) gilt die Komplexierung der Kupferionen durch den Imidazol-Stickstoff mehrerer Histidine als bewiesen (Abb. 4). (2) in direkter chemischer Umgebung des aktiven Zentrums werden auf Grund der Fluoreszenzeigenschaften von Hämocyaninen Tryptophanreste gefordert (BANNISTER und WOOD, 1971; LOEWE, 1978). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Aufgabe, die Beteiligung des Sequenzabschnittes -His-His-Trp-His-Trp-His- am Aufbau des aktiven Zentrums zu untersuchen und wenn möglich, die Kupferbindungsstelle zu identifizieren.

Abb. 4: Modell der Kupfer-Komplexierung im deoxy- und oxygenierten Hämocyanin (BROWN et al., 1980). Jeder Stickstoff gehört zu einem Imidazol-Ring, X ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein Tyrosinrest (SOLOMON, 1982, Review).



nach Brown et al. (1980)

Hierzu wurden Untersuchungen zur Stabilität des Kupfer-Protein-Komplexes durchgeführt: der Kupferverlust des Hämocyanins bei der Isolierung der Untereinheiten bzw. durch den Einfluß denaturierender Agenzien wurde quantitativ verfolgt.

B MATERIAL UND METHODEN

1 Chemikalien

Sämtliche Reagenzien waren, soweit erhältlich, von p.a. Qualität. Sie wurden von MERCK, Darmstadt, bezogen mit Ausnahme von

Biogel A 1.5 m	BIORAD, Richmond, Kalifornien
Biogel A 5 m	
Biogel P 10	
Eichproteine für die MG-Bestimmung	BOEHRINGER, Mannheim
Fluorescamin ("Fluram")	HOFFMANN-LA ROCHE, Basel
Stickstoff (nachgereinigt)	LINDE, München
Lampenargon (92 % Ar, 8 % N ₂)	
Ultrogel AcA 54	LKB-PRODUKTER, Bromma, Schweden
Ultrogel AcA 44	
Trisacryl GF 05	
Agarose M	
Kieselgel-DC-Platten SIL-G-25	MACHEREY & NAGEL, Düren
Sephadex G 10	PHARMACIA, Uppsala, Schweden
QAE-Sephadex A 50	
DEAE-Sephacel	
CM-Sepharose CL 6B	
DEAE-Sepharose CL 6B	
Sephacryl S 200 sf	
Sephacryl S 300 sf	
Chromatofocussing kit	
Triäthylamin	PIERCE, Rockford, Illinois
Pico-Puffer-System	

Polyamid-Fertigfolien	SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel
Acrylamid	SCHUCHARDT, München
N,N'-Methylenbisacrylamid	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Bromcyan	SERVA, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue	
N,N,N',N'-Tetramethyläthylen- diamin (TEMED)	
Ninhydrin	
Polyäthylenglykol	
Guanidinhydrochlorid	SIGMA, München
Spectrapor-Dialyseschläuche	SPECTRAPOR, Heidelberg

2 Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung

Die Haltung der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, einer im Süden von Nordamerika weit verbreiteten Art, und die Gewinnung der Hämolymphe dieser Spinnen erfolgte nach LOEWE und LINZEN (1973). Nach kurzzeitiger Abkühlung - die Tiere wurden für 1 h der Temperatur von 4° C ausgesetzt - wurde die Hämolymphe durch Punktion des dorsal gelegenen Herzens entnommen. Ungeachtet des Geschlechts und des Alters der Tiere wurde pro Aufarbeitung die Hämolymphe von 20 - 25 Vogelspinnen vereinigt. Zur Verhinderung der Gerinnung wurde das Blut durch sofortige Zentrifugation (3000 rpm bei 4° C für 10 min) vom Zellmaterial befreit.

3 Isolierung der Untereinheiten

Die Isolierung des Hämocyanins aus der Hämolymphe, die alkalische Dissoziation des 37 S-Moleküls in Dimere und Monomere sowie deren Trennung durch Gelfiltration erfolgte nach SCHNEIDER et al. (1977).

Die Untereinheiten a, b, c, d, e und f wurden über Ionenaustauschchromatographie (siehe S. 19), die Untereinheit g durch Chromatofokussierung (siehe S. 20) einzeln isoliert. Die Reinheitskontrolle der Untereinheiten erfolgte durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE, siehe S. 22) und/oder zweidimensionale Immunelektrophorese (siehe S. 23).

4 Proteinbestimmung und UV-Spektroskopie

Der Proteingehalt wurde routinemäßig durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß eine Extinktionseinheit ungefähr 1 mg Protein/ml entspricht (LOEWE und LINZEN, 1973).

Die UV-Spektren der Proteine wurden mit dem Spektralphotometer 118 der Fa. CARY im Bereich von 240 - 400 nm aufgenommen.

5 Dialyse

Pufferwechsel, Abtrennung niedermolekularer Bestandteile und die Konzentrierung von Proteinen wurden in Dialyseschläuchen der Fa. SERVA, Heidelberg, durchgeführt. Bei Peptiden mit einem $MG \leq 10.000$ wurden Dialyseschläuche der Fa. SPECTRAPOR, Heidelberg, mit einer Ausschlußgrenze von 3.500 Dalton verwendet.

6 Konzentrierungsmethoden

Zur Konzentrierung von 37 S-Hc bzw. von stabilen Dissoziationszwischenstufen wurden diese gegen eine 20 %ige (w/w) Polyäthylenglykollösung dialysiert. Das Dimeren- oder Monomergemisch sowie die isolierten Untereinheiten wurden zur Konzentrierung an den Anionenaustauscher DEAE-Sephrose CL 6B bei pH 9.6 gebunden und mit kleinen Volumina einer 0.5 M NaCl-Lösung wieder eluiert.

7 Analytische Ultrazentrifugation

Die Versuche zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten wurden von Herrn W. Stöcker durchgeführt. Es wurde die analytische Ultrazentrifuge der Fa. BECKMAN, Modell E, verwendet. Diese war ausgerüstet mit einem photoelektrischen Scanner und Multiplexer. Doppelsektorzellen mit Filled-Epon-Mittelstücken wurden benutzt. Die Zentrifugation fand bei 20° C und Umdrehungszahlen von 28.000 - 44.000 rpm statt. Die Absorption wurde bei einer Proteinkonzentration von 0.1 - 1.0 mg ml⁻¹ bei $\lambda = 280$ nm aufgezeichnet. Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte graphisch nach ELIAS (1969).

8 Sauerstoffbindungskurven

Von Frau A. Savel wurden die Sauerstoffbindungskurven nach der fluorimetrisch-polarographischen Methode von LOEWE (1978) aufgenommen und ausgewertet. Die Proben hatten eine Proteinkonzentration von 0.15 - 0.20 mg ml⁻¹, die Fluoreszenz wurde bei 350 nm gemessen, die Temperatur konstant auf 20 ± 0.1° C gehalten.

9 Kupferbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Kupfergehalts der Proben wurde mit einem Atomabsorptionsspektrometer der Fa. PERKIN-ELMER, Modell 400 durchgeführt.

2.5 - 25 µl der gelösten Proben mit einer Proteinkonzentration von 0.2 - 1.2 mg ml⁻¹ wurden mit der Graphitrohrküvette HGA-74 analysiert. Eine Kupferkathodenlampe diente als Lichtquelle. Lampenargon (92 % Ar, 8 % N₂) der Fa. LINDE, München, wurde als Schutzgas eingesetzt. Aus Kupfer-Standardlösungen (Titrisol) der Fa. MERCK, Darmstadt, wurden die Eichlösungen durch Verdünnen mit Wasser oder Pufferlösung hergestellt. Die Messungen wurden bei 324.7 nm und einer Spaltbreite von 0.7 nm (bei "mini-flow"-Betrieb während der Atomisierung) durchgeführt. Das für

die Kupferbestimmung proteinhaltiger Lösungen optimierte Programm für die Messungen in der Graphitrohrküvette ist in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Programm des HGA-74 zur Kupferbestimmung (Messungen bei 324.7 nm, Spaltbreite 0.7 nm und "mini-flow").

	Trocknen	therm. Zers.	Atomisieren	Ausglühen	Kühlen
Zeit	25 sec	30 sec	15 sec	15 sec	90 sec
Temp.	80° C	130 - 900° C	2.550° C	2.700° C	-
Digits	101	147 - 413 (8)	937	999	-

10 Darstellung von apo-Hämocyanin

Proteingebundenes Cu(I) wurde durch Zugabe von NaCN komplexiert. Die alkalische Hämocyaninlösung wurde mit einer 200 mM NaCN-Lösung auf 50 mM CN^- eingestellt, dabei wurde zur Darstellung der Cyanidlösung der Puffer der Proteinlösung verwendet: für 37 S-Hc Tris/HCl, pH 8.0, für Monomere $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.0, oder Glycin/ OH^- , pH 9.6.

Die Abnahme der Absorption der Hämocyanin-Lösung bei 340 nm wurde zeitabhängig nach der CN^- -Zugabe verfolgt. Das apo-Hc wurde nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur von niedermolekularen Substanzen und dem Kupfer-Cyanid-Komplex durch Gelfiltration über eine Trisacryl-Säule getrennt. Die Probenlösung wurde direkt vor dem Auftragen auf 10 mM $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_4$ eingestellt. Die Kupferkonzentration der Fraktionen des Eluats der Gelfiltration wurde mit der Atomabsorptionsspektroskopie (siehe S. 11) bestimmt.

11 Aminosäureanalyse

Zur Aminosäureanalyse wurden 1 - 2 nM Peptid der sauren Hydrolyse (6 N HCl, 24 h bei 110° C unter Stickstoff) unterworfen. Sollte auch Tryptophan erfaßt werden, wurde 2 % Thioglykolsäure zugesetzt (MATSUBARA und SASAKI, 1969; PENKE et al., 1974).

Das Hydrolysat wurde gefriergetrocknet und mit dem PIERCE-Pico-Puffersystem auf einem Liquimat III - Aminosäureanalysator der Fa. KONTRON analysiert. Diese automatischen Analysen führte Herr Dr. W. Schartau durch. Die Auswertung der Analysen erfolgte über die planimetrische Flächenbestimmung der einzelnen Aminosäurepeaks.

12 N-terminale Aminosäurebestimmung und Sequenzierung

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure und zur Sequenzierung isolierter Peptide wurde der nach CHANG et al. (1978) modifizierte EDMAN-Abbau durchgeführt. Die Konvertierung erfolgte durch Inkubation mit 50 %iger (v/v) Trifluoressigsäure, alle Reaktionen liefen bei 56° C unter Stickstoff ab. Die DABTH-Aminosäuren wurden auf DC-Fertigplatten (F-1700 Micropolyamid) der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL identifiziert.

Die Sequenzierung des "His-reichen Peptids" der photooxidierten Kette a wurde im MPI für Biochemie in Martinsried bei München von Herrn Dr. F. Lottspeich durchgeführt. Die automatische Flüssigphasensequenzierung erfolgte nach der EDMAN-Methode (EDMAN und HENSCHEN, 1975). Durch isokratische HPLC wurden die PTH-Aminosäuren identifiziert (LOTTSPEICH, 1980).

13 Proteinmodifikation

a) Mercaptolyse und Carboxymethylierung der SH-Gruppen

Die Proteine wurden in 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 M Tris, HCl, pH 8.2 ("Carboxymethylierungspuffer") gelöst. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde ein 100fach molarer Überschuß an β -Mercaptoäthanol (über Cys) zugesetzt. Unter Stickstoff wurde für 20 min bei 56° C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde dem reduzierten Protein ein 110facher molarer Überschuß an Jodessigsäure (über Cys), gelöst in 200 - 500 μ l 1 N NaOH, zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Stickstoff wurde die Carboxymethylierung durch Zugabe von

β -Mercaptoäthanol gestoppt. Überschüssige Reagenzien dieser nach CRESTFIELD et al. (1963) durchgeführten Carboxymethylierung wurde sofort durch Gelfiltration oder Dialyse unter Lichtaustausch vom Protein getrennt.

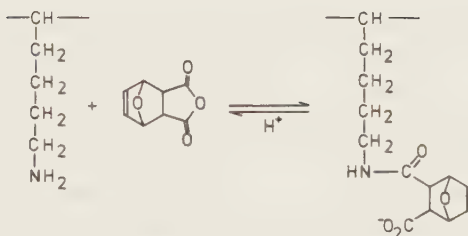
b) Oxidation mit Perameisensäure

Neben der Carboxymethylierung wurden die freien SH-Gruppen durch Oxidation mit Perameisensäure modifiziert. Diese Reaktion führt gleichzeitig zur Oxidation der Methionin-Seitenketten. Die Perameisensäure wurde für jeden Versuch frisch angesetzt: zu 950 μ l Ameisensäure wurden 50 μ l einer 30 %igen Wasserstoffperoxidlösung gegeben; die Inkubation erfolgte im Eisbad bei -5° C für 30 min. Das lyophilisierte Protein wurde in einer 20 %igen (v/v) Methanollösung in Ameisensäure gelöst und durch Zugabe des 12fachen molaren Überschusses an Perameisensäure (über die schwefelhaltigen Aminosäureseitenketten) oxidiert: zu je 1 mg der Untereinheit f wurden 6 μ l der Perameisensäurelösung gegeben. Die Reaktion wurde nach 150 min bei -5° C durch Verdünnen des Inkubationsansatzes mit eisgekühltem Wasser auf das 10fache Volumen abgebrochen, die Lösung anschließend lyophilisiert.

c) Blockierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins mit ETPA

Nach der Methode von RILEY et al. (1970) wurden die ϵ -Aminogruppen des Lysins durch ETPA-Kopplung modifiziert. Das Protein, gelöst in 0.2 M Natriumborat, pH 8.8 ("Kopplungspuffer"), wurde mit dem 12fachen molaren Überschuss über die Lysinreste mit ETPA (Exo-cis-3,6-endoxo- Δ^4 -tetrahydrophthalsäureanhydrid) versetzt. Vor der Zugabe wurde das ETPA im Kopplungspuffer gelöst. Während der 3-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert der Lösung mit 1 N NaOH im Bereich von pH 8.6 - 8.8 gehalten. Die Reaktion wurde durch Pufferwechsel abgebrochen und das Protein aus dem Kopplungspuffer in den Spaltpuffer der Trypsinolyse übergeführt.

Lys-Maskierung durch ETPA^{*)}



^{*)}ETPA = 3,5-endoxo- δ^4 -Tetrahydrophtalsäureanhydrid

d) Photooxidation

Das in 0.1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1, gelöste Protein (2 mg ml^{-1}) wurde für 1 - 8 h dem Licht einer 200 W-Quecksilberhochdrucklampe ausgesetzt. Die Bestrahlungsapparatur bestand aus Pyrex-Glas, das Wellenlängen unterhalb $\lambda = 300 \text{ nm}$ nicht durchläßt. Während der Bestrahlung wurde die Lösung kontinuierlich gerührt, ein Kühlmantel hielt die Temperatur der Lösung während der Versuchsdauer konstant auf $14 \pm 1^\circ \text{ C}$.

Bei einigen Versuchen wurde zwischen Proteinlösung und Strahlungsquelle eine 10 %ige (v/v) Acetonlösung der Schichtdicke 1 cm als Filter in den Strahlungsgang gebracht. Alle Bestrahlungsversuche fanden ohne Zusatz von organischen Farbstoffen als Photosensibilisatoren statt (TALLANDINI et al., 1975; De LEY und LONTIE, 1977).

14 Chemische Proteinspaltung

a) Bromcyanspaltung

Das lyophilisierte Protein wurde in 70 %iger (v/v) Ameisensäure bis zu einer Konzentration von 10 mg ml^{-1} gelöst und mit Bromcyan, gelöst in 70 %iger Ameisensäure, versetzt. Dabei wurde die BrCN-Konzentration auf einen 70fachen molaren Überschuß an Bromcyan (über Methionin) eingestellt. Die Reaktion lief im Dunkeln unter Stickstoff für 5 h bei 37°C ab. Zur Klärung der Abhängigkeit der Reaktion von der Temperatur und der Zeit wurden Spaltungen bei Raumtemperatur, 37°C und 56°C von 0 - 24 h durchgeführt. Die BrCN-Spaltung wurde durch Verdünnen des Inkubationsansatzes mit eisgekühltem Wasser auf das 10fache Volumen abgestoppt. Der Verlauf der Spaltung wurde mit der SDS-PAGE (siehe S. 22) und der Aminosäureanalyse (siehe S. 12) untersucht.

b) Säurespaltung

Das lyophilisierte Protein wurde zur Säurespaltung in 70 %iger (v/v) Ameisensäure gelöst. Die Spaltung wurde bei 56°C zeitabhängig von 0 - 6 h durchgeführt. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Säurekonzentration wurde mit 70 %iger, 35- und 17.5 %iger (v/v) Ameisensäure untersucht. Die Spaltung wurde durch Verdünnen des Inkubationsansatzes mit eiskühltem Wasser und anschließender Lyophilisation beendet.

c) Spaltung mit o-Jodosobenzoesäure

Das carboxymethylierte Protein wurde zur spezifischen Spaltung bei Tryptophanresten in 80 %iger (v/v) Essigsäure, 4 M Guanidinhydrochlorid gelöst und mit der doppelten Menge o-Jodosobenzoesäure für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

15 Enzymatische Proteinspaltungen

a) Trypsinolyse

Die tryptische Hydrolyse wurde in Anlehnung an KATZ et al. (1959) und CANFIELD (1963) durchgeführt. Die Suspension des carboxymethylierten Proteins in 0.1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8.1 ("Spaltungspuffer") wurde mit TPCK-behandeltem Trypsin, gelöst im Spaltungspuffer, versetzt. Das Substrat:Enzym-Verhältnis wurde auf 50:1 (w/w) eingestellt.

Die Trypsinolyse wurde nach 12 h bei 37° C durch Ansäuern des Inkubationsansatzes mit Eisessig abgestoppt, anschließend wurde das Peptidgemisch lyophilisiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C aufbewahrt.

Zur Spaltung spezifisch nur nach Arginin wurde als Substrat das carboxymethylierte und mit ETPA modifizierte Protein (siehe S. 14) eingesetzt.

Zur limitierten Trypsinolyse wurde unter identischen Reaktionsbedingungen "natives" Protein, im Spaltungspuffer gelöst, als Substrat eingesetzt. Dabei wurde die Zeitabhängigkeit der Spaltung von 0 - 6 h in der SDS-PAGE verfolgt. Unter "nativ" wurden Proteine definiert, die außer den notwendigen Manipulationen ihrer Isolierung keinen weiteren Modifikationsreaktionen ausgesetzt waren und nach der Isolierung sofort wieder in einen neutralen bis schwach alkalischen (pH 7 - 8) Puffer überführt wurden.

b) Spaltung mit Chymotrypsin

Die Bedingungen der limitierten Trypsinolyse wurden mit folgender Abänderung übernommen: das Substrat:Enzym-Verhältnis wurde auf 100:1 (w/w) eingestellt.

c) Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease

Die Bedingungen der limitierten Proteolyse mit Trypsin wurden übernommen. Die Reaktion wurde zeitabhängig in der SDS-PAGE verfolgt.

d) Proteolyse mit Subtilisin

Die Reaktionsbedingungen der Spaltung des "nativen" Proteins mit Subtilisin waren mit den Bedingungen der limitierten Trypsinolyse identisch.

16 Gelfiltration

Bei allen gelchromatographischen Trennungen wurde die Extinktion des Eluats bei 206 und 280 nm verfolgt.

Die großen Spaltprodukte der Kette f nach Spaltung mit Bromcyan ($MG > 5.000$) wurden auf einer Ultrogel AcA 54- oder einer Sephacryl S 300 sf-Säule (3×160 cm) getrennt. Als Elutionspuffer wurde 8 M Harnstoff/HCl, pH 3.5 verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 8 ml h^{-1} , gesammelt wurde in Stundenfraktionen.

Die kleinen Peptide der BrCN-gespaltenen Kette f ($MG < 5.000$) wurden auf einer Biogel P 10-Säule (1.5×160 cm) isoliert. Das Äquilibrieren der Säule und die Elution der Peptide wurde mit 5 %iger (v/v) Essigsäure durchgeführt. Die Durchflußrate betrug 5 ml h^{-1} , gesammelt wurde in 45 min-Fractionen.

Die nach limitierter Trypsinolyse der Kette a bzw. f erhaltenen Peptide wurden über eine Ultrogel AcA 54-Säule (1.5×160 cm) vorgetrennt, die mit dem Elutionspuffer 0.1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, 4 M Harnstoff, 5 mM β -Mercaptoäthanol äquilibriert war. Bei einem Durchfluß von 3.5 ml h^{-1} wurden 45 min-Fractionen gesammelt.

Zur Auftrennung des nach Trypsinolyse der photooxidierten Untereinheit a erhaltenen Peptidgemisches wurde eine Sephacryl S 200 sf-Säule (1.5×160 cm) eingesetzt. Eluiert wurde mit 8 M Harnstoff/HCl, pH 3.5 und einer Durchflußgeschwindigkeit von 3 ml h^{-1} , gesammelt wurden 30 min-Fractionen.

Um niedermolekulare Substanzen wie Harnstoff von den Peptiden zu trennen, wurden diese über eine Sephadex G 10-Säule (1.5×160 cm), die mit 5 %iger (v/v) Essigsäure äquilibriert war, filtriert. Die Durchflußrate betrug 10 ml h^{-1} .

Als wesentlich günstiger erwies sich die Verwendung einer Trisacryl-Säule (2.5 x 30 cm). Bei gleichem Elutionspuffer konnte mit Trisacryl das Durchflußvolumen auf 50 ml h^{-1} erhöht werden. Die Extinktion des Eluats bei 280 nm wurde aufgezeichnet.

17 Ionenaustauschchromatographie

a) Isolierung der Untereinheiten

Untereinheiten a, d, e: Die Untereinheiten d und e wurden durch Anionenaustauschchromatographie des Monomereingemisches nach SCHNEIDER et al. (1981) gewonnen. Die dabei anfallende Untereinheit a mußte durch eine Rechromatographie unter den identischen Bedingungen nachgereinigt werden.

Untereinheiten b, c, f: Die Isolierung der das Dimerengemisch bildenden Untereinheiten erfolgte schrittweise über zwei Ionenaustauschchromatographien. Im ersten Anionenaustausch wurden die Untereinheiten b, f und bc (als Gemisch oder Heterodimer, oder beiden) isoliert. Bis zu 250 mg des im alkalischen Dissoziationspuffer gelösten Dimerengemisches wurden auf eine DEAE-Sephacel C1 6B-Säule (1.5 x 30 cm) aufgetragen. Die Säule war mit dem Startpuffer $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, pH 9.6 äquilibriert. Eluiert wurde mit einem linearen Salzgradient von 0.075 - 0.25 M NaCl im Startpuffer. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 10 ml h^{-1} lief der Gradient über 40 h, gesammelt wurden 45 min-Fraktionen. Als weitere Anionenaustauscher wurden DEAE-Sephacel und QAE-Sephadex A 50 eingesetzt, als Startpuffer kamen auch $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$, pH 9.6 ($I = 0.1$) und Tris/HCl, 1 M Harnstoff, 5 mM EDTA, pH 8.8 ($I = 0.05$) zur Anwendung.

Die Untereinheit c wurde aus dem bc-Peak des ersten Ionenaustauschs unter Zusatz von 4 M Harnstoff isoliert. Dabei wurde DEAE-Sephacel C1 6B als Austauschermaterial und Tris, HCl, 4 M Harnstoff, 5 mM EDTA, pH 8.8 als Startpuffer eingesetzt. Vor dem Auftragen wurde das Proteingemisch zur Dissoziation über Nacht gegen den Startpuffer dialysiert. Eluiert wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0.1 - 0.3 M NaCl. Der Gradient

lief bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 12 ml h^{-1} über 42 h, gesammelt wurden 60 min-Fraktionen. Die Extinktion der Eluate aller Ionenaustauschchromatographien zur Isolierung von Untereinheiten wurde bei 280 nm verfolgt.

b) Trennung von Peptiden

Peptidgemische wurden durch Anionenaustauschchromatographie mit einer DEAE-Sephacryl-Säule ($0.6 \times 15 \text{ cm}$) getrennt; die Säule wurde mit dem Startpuffer 8 M Harnstoff, Tris, HCl, pH 8.0 äquilibriert, vor dem Auftragen wurde die Peptidlösung mit konzentrierter Tris-Lösung auf pH 8.0 eingestellt. Die Peptide wurden mit einem linearen Salzgradienten von 0.0 - 0.1 M oder 0.0 - 0.2 M KCl im Startpuffer bei einem Durchfluß von 5 ml h^{-1} eluiert und in 60 min-Fraktionen gesammelt. Das Gradientenvolumen betrug 200 ml. Peptidhaltige Fraktionen wurden sofort mit wenigen Tropfen Eisessig angesäuert.

Die Trennung der Peptide des MG-Bereichs um 14.000 nach BrCN-Spaltung der Kette f wurde auch durch Kationenaustauschchromatographie versucht. Dabei kam eine CM-Sepharose Cl 6B-Säule ($0.6 \times 15 \text{ cm}$) - äquilibriert mit Natriumacetatpuffer, pH 4.5, 8 M Harnstoff - zur Anwendung. Salzgradient und Elutionsgeschwindigkeit waren wie bei den Anionenaustauschchromatographien.

18 Chromatofokussierung

Zur Trennung der Untereinheiten durch Chromatofokussierung wurde ein pH-Gradient von pH 7 - pH 4 eingesetzt. Auf eine mit PBE 94-Gel gefüllte Säule ($1.5 \times 30 \text{ cm}$) wurden 60 mg Proteingemisch, gelöst in 10 ml Startpuffer, aufgetragen. Die Säule wurde mit dem Startpuffer von 0.025 M Imidazol, 2 M Harnstoff, HCl, 5 mM EDTA, pH 7.4 äquilibriert. Direkt vor dem Auftragen wurden 5 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit 200 ml Elutionspuffer. Dieser enthielt 25 ml "Polybuffer 74", 2 M Harnstoff und war mit 0.5 N HCl auf pH 4.0 eingestellt worden. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 6 ml h^{-1} , die Extinktion des Eluats wurde kontinuierlich bei 280 nm verfolgt. Der pH-Wert jeder Fraktion wurde gemessen.

19 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Extinktion des Eluats aller HPLC-Läufe wurde bei 210 nm verfolgt, es wurde von Hand fraktioniert. Das lyophilisierte Peptidgemisch wurde in 100 - 200 µl 70 %iger (v/v) Ameisensäure gelöst, jeweils 10 - 100 µl wurden auf eine C₁₈-reversed-phase Säule der Fa. MERCK (Hibar RT 250-4, LiChrosorb RP 18, 7 µm) oder der Fa. CHROMPACK (Vydac TP RP 10, custom made) aufgetragen. Startpuffer war ein 0.5 M Ammoniumacetatpuffer, pH 6.0. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 42 % (v/v) Acetonitril im Startpuffer (KRATZIN et al., 1980). Als weiteres Elutionssystem wurde 0.1 %ige (v/v) Trifluoressigsäure und ein linearer Gradient von 0 - 42 % Acetonitril (v/v) in der TFA-Lösung verwendet. Die Durchflußrate betrug 2 ml min⁻¹, die Dauer des Gradienten 40 min. Bei Rechromatographien wurde zur Optimierung der Peptidtrennungen die Steilheit des Gradienten sowie die Anfangs- und Endkonzentration des Acetonitrils stark variiert.

20 Fingerprints

Die tryptischen Peptide der Kette f wurden zweidimensional nach der Fingerprint-Technik von BATES und PERHAM (1975) aufgetrennt. Das lyophilisierte Peptidgemisch, 0.2 mg gelöst in 20 µl 0.1 M Ammoniak, wurde auf SIL-G-25 DC-Platten der Fa. MACHEREY & NAGEL aufgetragen. Direkt gegenüber dem Startfleck, knapp unter dem oberen Rand der Platte, wurden 5 µl einer Markerklösung aufgetragen. Die Markermischung setzte sich zusammen aus Asp, Gly, His, Lys, DNP-Asp und DNP-Lys, zu je 1 mg ml⁻¹ gelöst in 0.1 M Ammoniak.

1. Dimension: Elektrophorese

Nach gleichmäßigen Befeuchten der DC-Platten mit Elektrophoresepuffer wurde die Elektrophorese in einer DESAGA-DE-Doppelkammer mit dem Netzgerät LKB 2103 bei einer Spannung von 500 V durchgeführt. Dabei wurde eine Stromstärke von 20 mA erreicht. Die Elektrophorese fand bei 0° C statt, die Verbindung zwischen den DC-Platten und den Elektroden wurde durch in den Elektro-

phoresepuffer eintauchende Celluloseacetat-Streifen gewährleistet. Der Elektrophoresepuffer war ein Pyridin-Eisessig-Wasser-Gemisch im Volumenverhältnis 25:1:225, pH 6.5. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der DNP-Asp-Fleck 2 cm vom anodischen Rand entfernt war. Die DC-Platten wurden anschließend bei 110° C für 45 min getrocknet.

2. Dimension: Dünnschichtchromatographie (DC)

Als Laufmittel für die aufsteigende DC wurde ein Gemisch aus n-Butanol, Eisessig, Wasser (3:1:1) verwendet. Die Dünnschichtchromatographie wurde abgestoppt, sobald die Lösungsmittelfront 2.5 cm vom oberen Plattenrand entfernt war. Auf eine waagerechte, temperaturkonstante Aufstellung der DC-Kammer und auf eine gesättigte Kammeratmosphäre wurde geachtet. Nach Trocknung der DC-Platten wurden die einzelnen Peptide durch Anfärben mit Fluorescamin lokalisiert (FELIX und JIMENEZ, 1974). Die Platten wurden unter UV-Licht ausgewertet.

21 Elektrophoresen

a) Analytische Plattengelelektrophorese (PAGE)

Die Elektrophoresen wurden in einer Gelapparatur der Fa. HÖLZEL, Dorfen (Obb.) durchgeführt. Die Elektrophoresen erfolgten im Gelsystem 6 nach MAURER (1968) oder bei pH 8.8 nach LAEMMLI (1970), aber ohne SDS, mit einem linearen Acrylamidgradienten von 5 - 10 % oder bei konstanter Acrylamidkonzentration von 7.5 %. Die Elektrophoresen hatten bei Raumtemperatur und 180 V bzw. bei 4° C und 200 V eine Laufzeit von 3 - 4 h. Die optimale Auftragsmenge war 5 µg Protein pro Bande.

b) Analytische SDS-PAGE

Trenn- und Sammelgel wurden auf 0.1 %, der Elektrodenpuffer auf 0.2 % SDS eingestellt, ansonsten wurden die Bedingungen, wie unter a) beschrieben, gewählt (LAEMMLI, 1970), wobei Acrylamidgradienten auch von 10 - 20 % oder eine konstante Acrylamid-

konzentration von 15 % eingesetzt wurden.

Für a) und b) wurden Polyacrylamidplattengele mit einer Schichtdicke von 1.5 mm verwendet. Als Sammelgel wurde ein 3 %iges Acrylamidgel von pH 6.8 auf das Trenngel aufgebracht. Vor dem Auftragen wurden die Proteine für die SDS-PAGE nach WEBER und OSBORN (1969) mit SDS und β -Mercaptoäthanol denaturiert.

c) Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese wurde von Herrn B. Kempster und Herrn W. Stöcker nach WEEKE (1973) durchgeführt. Plastikplatten der Fa. LKB wurden als Trägermaterial verwendet. 1 % Agarose M (LKB) in 0.12 M Natriumbarbiturat pH 8.6 (I = 0.02) wurde als Gel eingesetzt. In der zweiten Dimension wurden 2 - 4 ml Antiserum pro 100 ml Gel verwendet. Die Experimente liefen in einer LKB 2117 Multiphor-Apparatur ab.

d) Anfärben der Gele

Die Banden wurden mit Coomassie Brilliant Blue G 250 gefärbt (BRAMHALL et al., 1969; WEBER und OSBORN, 1969). Entfärbt wurde in einem Wasser-Methanol-Eisessig-Gemisch im Volumenverhältnis 175:10:15.

e) MG-Bestimmung mit der SDS-PAGE

Die Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen und Peptiden wurden bis zu einer unteren Grenze von 5.000 in der SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) mit folgenden Eichproteinen durchgeführt: Phosphorylase a (95.000), Rinderserumalbumin (67.000), Ovalbumin (43.000), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36.000), Chymotrypsinogen A (26.000), Trypsin-Inhibitor aus der Sojabohne (21.000), Myoglobin vom Wal (17.000), Lysozym (14.300), Cytochrom c (12.500) und Aprotinin (6.500). Die Eichproteine wurden so auf das Gel aufgetragen, daß sie die Proben mit unbekanntem Molekulargewicht einrahmten. Eine Konzentration von 0.7 μ g Protein pro Bande war die optimale Auftragsmenge.

C ERGEBNISSE

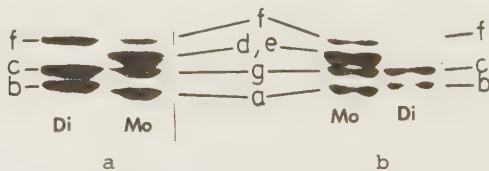
1 Zur Isolierung der Untereinheiten

1.1 Isolierung der Untereinheit f

Die alkalische Dissoziation des 37 S-Hämocyanins führte zu einem quantitativen Zerfall des 24-mers in Monomere und Dimere (SCHNEIDER et al., 1977). Nach der gelchromatographischen Trennung der Dimeren von den Monomeren konnten durch SDS-PAGE im Dimerengemisch die Untereinheiten b, c und f, im Monomergemisch die Untereinheiten a, d, e, f und g nachgewiesen werden (Abb. 5):

Abb. 5: SDS-PAGE (5- 10 % Acrylamid) des Monomeren- und Dimerengemisches einer Aufarbeitung.

a) Untereinheit f im Dimerengemisch angereichert; b) Untereinheit f nicht im Dimerengemisch angereichert. Die schwächere Bande im Dimerengemisch zwischen Bande c und f ist auf eine Verunreinigung des Dimerengemisches durch die monomeren Untereinheiten d und e zurückzuführen.



Als einzige der Untereinheiten lag Untereinheit f sowohl dimer als auch monomer vor. Das Mengenverhältnis der Untereinheit f aus dem Monomeren- und dem Dimerengemisch war von Isolierung zu Isolierung unterschiedlich (Abb. 5), im allgemeinen erschien Untereinheit f etwas mehr in der Dimerenfraction vorzuliegen (ausführlich wird darauf auf S. 91 eingegangen).

Das Homodimer f_2 kann durch Behandlung mit 5mM Cystein quantitativ in die Monomere gespalten werden und läßt sich durch Gel-filtration von dem Heterodimer bc trennen, das gegenüber reduzierenden Agenzien inert ist (SCHNEIDER et al., 1977).

Ein großer Nachteil dieser Methode ist, daß alle monomeren Untereinheiten, die noch als Verunreinigungen im Dimerengemisch (nach der Gelfiltration des 37 S-Dissoziats) vorliegen, jetzt in den f-haltigen Fraktionen auftreten. Daher wurde eine von Aufarbeitung zu Aufarbeitung unterschiedlich starke Verunreinigung der Untereinheit f mit anderen Hämocyanin-Untereinheiten beobachtet. Je nach der Vollständigkeit der Trennung von Monomeren und Dimeren nach Dissoziation des 37 S-Hämocyanins konnten in der isolierten Untereinheit f weitere Untereinheiten nachgewiesen werden, wie es die zweidimensionale Immunelektrophorese in Abb. 6 verdeutlicht.

Abb. 6: Zweidimensionale Immunelektrophorese der präparativ isolierten Untereinheit f als Reinheitskontrolle.



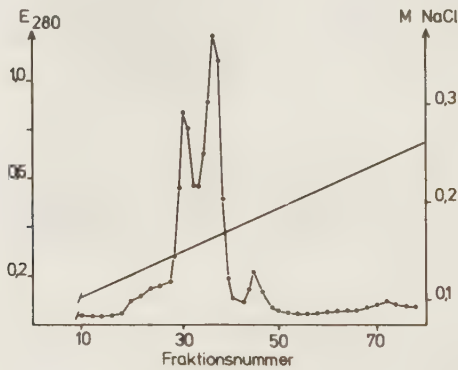
1.2 Nachreinigung der Untereinheit f durch Ionenaustauschchromatographie

Für die proteinchemische Charakterisierung der Untereinheit f war daher eine Nachreinigung notwendig. Da sich die isoelektrischen Punkte (IEP) der einzelnen Untereinheiten deutlich voneinander unterscheiden (SCHNEIDER et al., 1977), wurde versucht, die Untereinheit f von den anderen Untereinheiten durch Ionenaustauschchromatographie zu trennen. Es wurden Anionenaustauschchromatographien im pH-Bereich von pH 8.8 bis pH 10 durchgeführt. Wegen der starken Reassoziations-tendenz von Untereinheitengemischen im neutralen bis schwach alkalischen pH-Bereich (DECKER, 1981) mußte den Elutionspuffern mit pH-Werten < 9.6 Harnstoff zugesetzt werden. Von den drei eingesetzten Ionenaustauschern

DEAE-Sephacel, DEAE-Sepharose CL 6B und QAE-Sephadex A 50 zeigte DEAE-Sepharose CL 6B mit einem Tris/HCl, 1 M Harnstoff-Puffer, pH 8.8 und einem linearen Salzgradienten von 0.1 - 0.3 M NaCl die besten Ergebnisse (Abb. 7). Auffallend war, daß die Untereinheit f als Doppelpeak von der Säule eluiert wurde (siehe S. 32).

Abb. 7: Nachreinigung der Untereinheit f über DEAE-Sepharose CL 6B in Tris/HCl, 1 M Harnstoff, pH 8.8; linearer Salzgradient von 0.1 - 0.3 M NaCl über 46 h; Durchflußgeschwindigkeit 10 ml h⁻¹, 30 min-Fraktionen; a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid) einiger Fraktionen; R: Material vor der Ionenaustauschchromatographie.

a)



b)



Da die Nachreinigung der Untereinheit f über die Anionenaustauschchromatographie zu einer Trennung der einzelnen Untereinheiten führte (Abb. 7), wurde versucht, die Untereinheit f durch Ionenaustausch direkt aus dem Monomeren- bzw. Dimerengemisch des 37 S-Dissoziats präparativ zu isolieren.

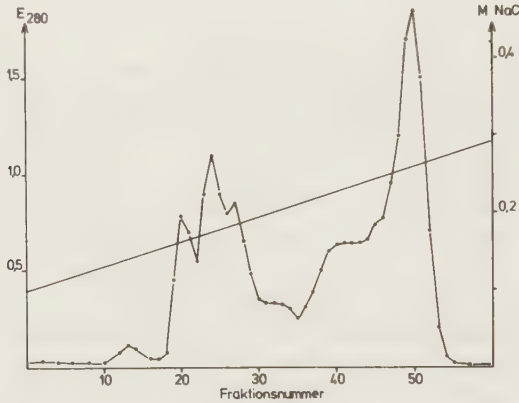
1.3 Versuche zur Isolierung der Untereinheit f aus dem Monomeren- bzw. Dimerengemisch durch Ionenaustauschchromatographie

Die von SCHNEIDER et al. (1980) entwickelte Methode zur präparativen Isolierung der Untereinheiten e und d aus dem Monomeren- bzw. Dimerengemisch ergab keine Trennung der Untereinheiten f und g voneinander. Veränderungen der Anionenaustauschbedingungen (es wurde als Austauscher QAE-Sephadex A 50 und als Elutionspuffer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, pH 9.6 eingesetzt) führten nicht zu einer Verbesserung. Da bei keiner der durchgeführten Chromatographien auch nur ein Ansatz einer Trennung von Untereinheit f und g zu erkennen war, wurde der Versuch, die Untereinheit f aus dem Monomeren- bzw. Dimerengemisch zu isolieren, aufgegeben.

Wurden die Bedingungen der Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung der Untereinheiten a, d und e aus dem Monomeren- bzw. Dimerengemisch (SCHNEIDER et al., 1980) zur Isolierung der Untereinheit f aus dem Dimerengemisch übernommen, so kam es zu einer deutlichen Abtrennung der Untereinheit f von den Untereinheiten b und c des Heterodimers bc (Abb. 8). Die in der SDS-PAGE durchgeführten Analysen zeigten allerdings noch Verunreinigungen mit anderen Untereinheiten. Da die Verunreinigungen möglicherweise auf Reassoziationsprodukte zurückzuführen waren, wurde der Ionenaustausch bei höherem pH-Wert durchgeführt: statt des Tris/HCl, 1 M Harnstoff-Puffers pH 8.8, wurde ein Bikarbonatpuffer pH 9.6 verwendet. Dieser Puffer führt - wie der Glycin/ OH^- -Puffer, pH 9.6 der alkalischen Dissoziation - zu einer quantitativen Dissoziation des 37 S-Moleküls in Monomere und Dimere, wie ein Vorversuch zeigte. Damit sollte eine Reassoziationsverhinderung während des Ionenaustausches verhindert werden.

Abb. 8: Ionenaustauschchromatographie der Dimeren über DEAE-Sepharose CL 6B in Tris/HCl, 1 M Harnstoff, pH 8.8; Salzgradient von 0.1 - 0.4 M NaCl über 36 h; Durchflußgeschwindigkeit 12 ml h⁻¹, 45 min-Fraktionen; a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid) einzelner Fraktionen

a)



b)

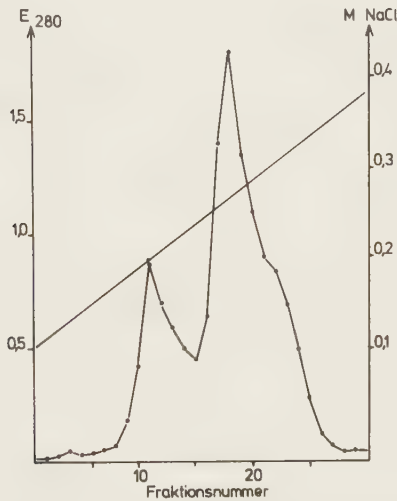


Die Chromatographie über DEAE-Sepharose CL 6B im Bikarbonatpuffer, pH 9.6, mit einem linearen Salzgradienten von 0.1 - 0.4 M NaCl über 15 h führte zur Isolierung einer nur gering verunreinigten Untereinheit f, wie die SDS-PAGE (Abb. 9b) ergab. Allerdings war die Trennung zwischen dem f- und dem bc-Gipfel nicht vollständig (Abb. 9a); nur aus den Fraktionen des aufsteigenden Astes des f-Peaks wurde Untereinheit f sauber isoliert (Fr. 9 - 11 von Abb. 9a). Mit einem flacheren Gradienten - 0.1 - 0.2 M NaCl - wurde schließlich eine zufriedenstellende

Abtrennung der Untereinheit f von den Untereinheiten des Heterodimers bc erzielt (Abb. 10).

Abb. 9: Ionenaustauschchromatographie der Dimeren über DEAE-Sepharose CL 6B in Bikarbonatpuffer, pH 9.6; Salzgradient von 0.1 - 0.4 M NaCl in 16 h; Durchflußgeschwindigkeit 10 ml h^{-1} , 30 min-Fractionen;
a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid) einiger Fractionen.

a)

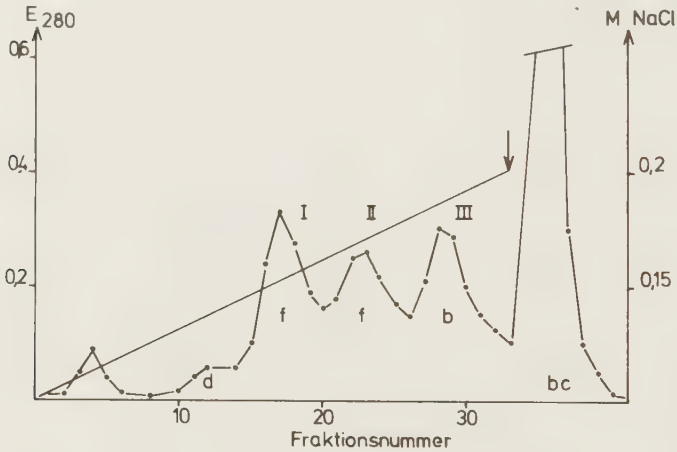


b)

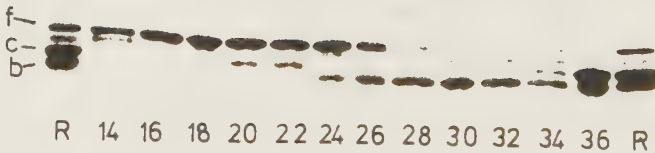


Abb. 10: Ionenaustauschchromatographie der Dimeren wie unter Abb. 9a beschrieben, nur der Salzgradient wurde auf 0.1 - 0.2 M NaCl geändert; ↓ Zugabe von 1 M NaCl;
a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid) von einigen Fraktionen; R: Material vor der Ionenaustauschchromatographie

a)



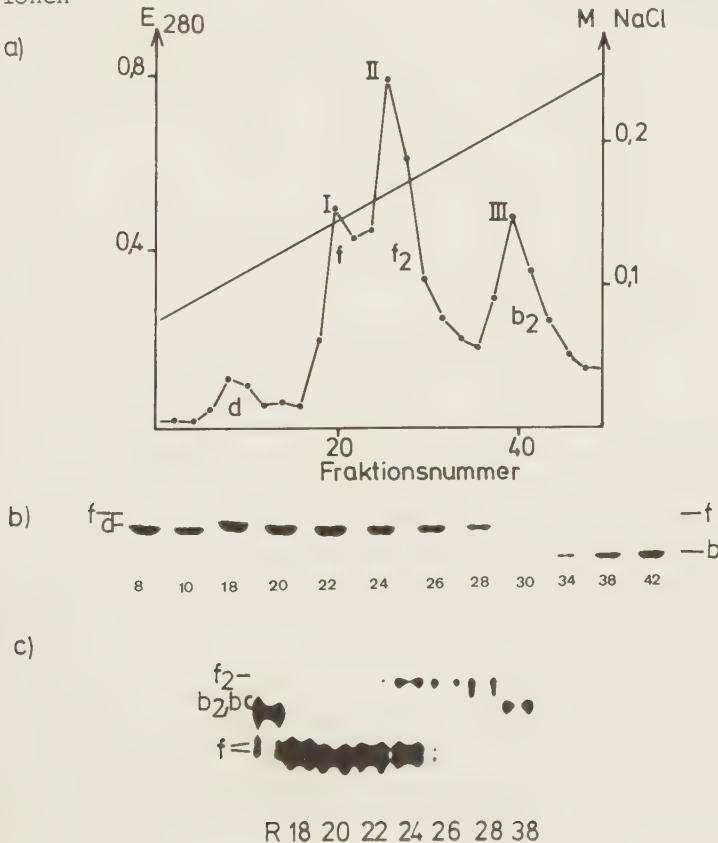
b)



Sowohl Peak I als auch Peak II enthielten Untereinheit f, wobei in Peak II die Untereinheit f leicht verunreinigt vorlag (Abb. 10b). Peak III enthielt, ebenfalls mit leichten Verunreinigungen, die Untereinheit b. Das meiste Material des Heterodimers bc blieb bei diesen Trennbedingungen am Ionenaustauscher gebunden, von dem es mit 1 M NaCl abgelöst wurde (Abb. 10a).

Um eine noch bessere Auftrennung des Vorpeaks, der die Unter-
einheit d enthielt (Abb. 10a, Fr. 10 - 15) vom Peak I zu er-
reichen, wurde die Ausgangskonzentration des Salzgradienten
von 0.1 auf 0.075 M NaCl gesenkt. Gleichzeitig wurde durch
Verlängerung der Laufzeit des Gradienten auf 40 h die Steilheit
des Salzgradienten nochmals erniedrigt, um eine schärfere Ab-
trennung von Peak II und Peak III zu bekommen. Die Ergebnisse
dieses Versuches sind in Abb. 11 dargestellt.

Abb. 11: Ionenaustauschchromatographie der Dimeren, Bedingun-
gen wie unter Abb. 10 beschrieben mit folgenden Änderungen:
linearer Salzgradient von 0.075 - 0.25 M NaCl über 40 h;
a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid)
einiger Fraktionen; c) PAGE (5 - 10 % Acrylamid) einiger Frak-
tionen



Unter diesen Bedingungen - DEAE-Sepharose CL 6B als Austauscher, Bikarbonatpuffer pH 9.6, linearer Salzgradient von 0.075 - 0.25 M NaCl über 40 h - wird seitdem die Untereinheit f präparativ isoliert. Die Fraktionen des f-Doppelpeaks (Peak I und II der Abb. 11) wurden durch die zweidimensionale Immunelektrophorese analysiert. Während in den ersten f-haltigen Fraktionen (Peak I) die Untereinheit d nachzuweisen war, nahm Untereinheit c mit steigender Fraktionsnummer an Konzentration zu, so daß Untereinheit f nur im Maximum von Peak I (Fraktion 19, Abb. 11) ohne Verunreinigung vorlag.

Abb. 12: zweidimensionale Immunelektrophorese der Fraktion 19 des Ionenaustausches von Abb. 11



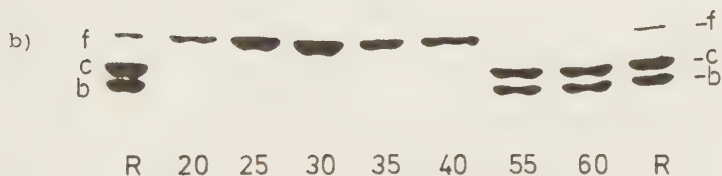
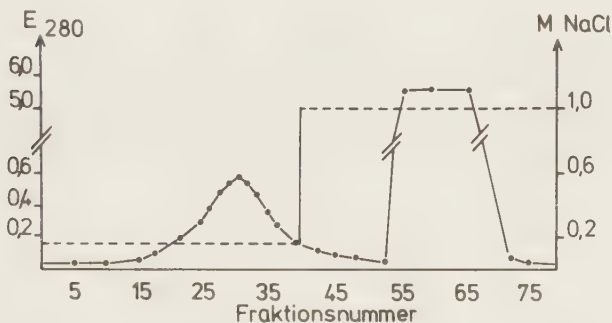
Eine Bestimmung der Sedimentationskonstanten der einzelnen Peaks zeigte, daß Peak I mit 4.91 S Monomere, Peak II mit 6.51 S und Peak III mit 6.59 S Dimere enthielt.

Die Trennung f/bc gelingt auch, wenn der Austauscher nach Bindung des Dimerengemisches einfach mit 0.15 M NaCl in Bikarbonat, pH 9.6, gespült wird. Dabei bleibt bc vollständig am Austauscher gebunden, während die Untereinheit f quantitativ eluiert wird. Allerdings wird mit der Untereinheit f auch Untereinheit d abgelöst. Daher wurde dieses sehr schnelle Trennverfahren zur routinemäßigen Isolierung der Untereinheit f nicht eingesetzt. Zur Isolierung des Heterodimers bc allerdings stellt es die optimale Methode dar (Abb. 13).

Abb. 13: Ionenaustauschchromatographie zur Trennung der Dimeren; DEAE-Sephadose CL 6B in Bikarbonat, pH 9.6; nach dem Auftragen der Probe wurde mit 0.15 M NaCl in Bikarbonat, pH 9.6 eluiert,¹ abschließend mit 1.0 M NaCl; Durchflußgeschwindigkeit 30 ml h⁻¹, 20 min.-Fraktionen.

a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid) einiger Fraktionen.

a)



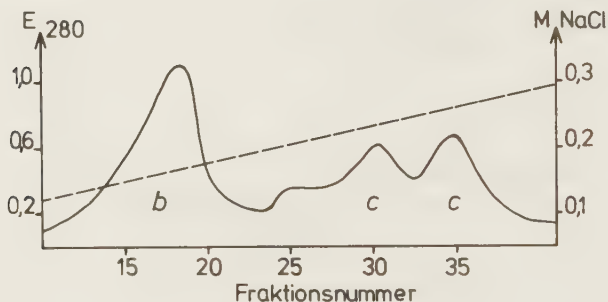
1.4 Isolierung der Untereinheiten b und c

Nach Abtrennung des Heterodimers f_2 aus dem Dimerengemisch durch Ionenaustauschchromatographie (siehe S.31) wurde das die Untereinheiten b und c enthaltende Material gegen 4 M Harnstoff dialysiert. Dabei kommt es zu einer quantitativen Dissoziation des Heterodimers bc. Da der Anionenaustausch an DEAE-Sephadex A-50 in 0.1 M Natriumphosphatpuffer, 4 M Harnstoff, pH 6.5 (MARKL et al., 1979) nur eine geringe Ausbeute an reinen Untereinheiten b und c erbrachte, wurde versucht, diese durch Änderungen der Ionenaustauschbedingungen zu erhöhen. Dieses ge-

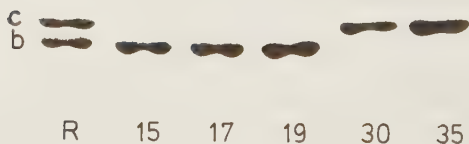
lang mit DEAE-Sepharose CL 6B in Tris/HCl, 4 M Harnstoff-Puffer, pH 8.8 und einem linearen Salzgradienten von 0.1 - 0.3 M NaCl über 50 h (Abb. 14). Das UV-Spektrum der isolierten Untereinheit c zeigte eine nur sehr schwache Absorption bei 340 nm (Abb. 15) und einen Kupfergehalt von 45 % der Theorie (auf den Kupferverlust bei der Isolierung der einzelnen Untereinheiten wird ausführlich auf S. 55 eingegangen).

Abb. 14: Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung der Untereinheit b und c; DEAE-Sepharose CL 6B in Tris/HCl, 4 M Harnstoff-Puffer, pH 8.8; Salzgradient von 0.1 - 0.3 M NaCl über 42 h; Durchflußgeschwindigkeit 12 ml h⁻¹, 60 min-Fractionen. a) Elutionsprofil bei 280 nm; b) SDS-PAGE (5 - 10 % Acrylamid) einiger Fraktionen; R: Material vor der Ionenaustauschchromatographie.

a)

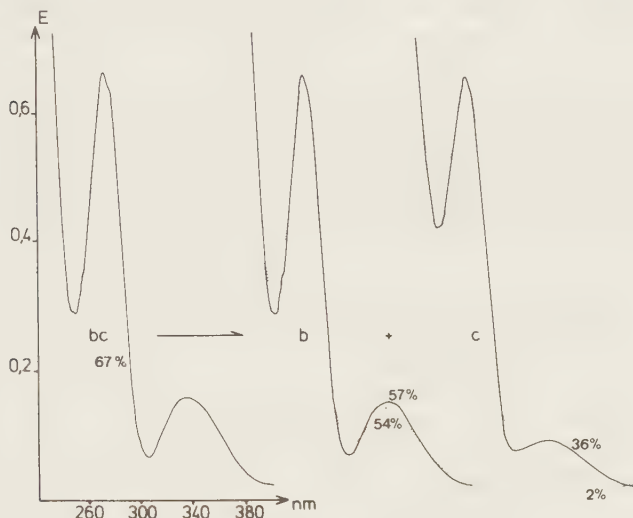


b)



Die signifikante Erhöhung der Absorption bei 245 nm (ausführliche Diskussion der UV-Spektren von Hämocyaninlösungen auf S. 97) ist ein weiterer Hinweis auf Störungen der Tertiärstruktur. Bei der Untereinheit b dagegen ist die Absorptionsbande bei 340 nm nur relativ wenig herabgesetzt. Die Untereinheit c

Abb. 15: UV-Spektren und Kupfergehalt (in % des theoretischen Wertes) des Heterodimers bc und der isolierten Untereinheiten (—); nach Dialyse der isolierten Untereinheiten gegen harnstoff-freien Puffer (...).



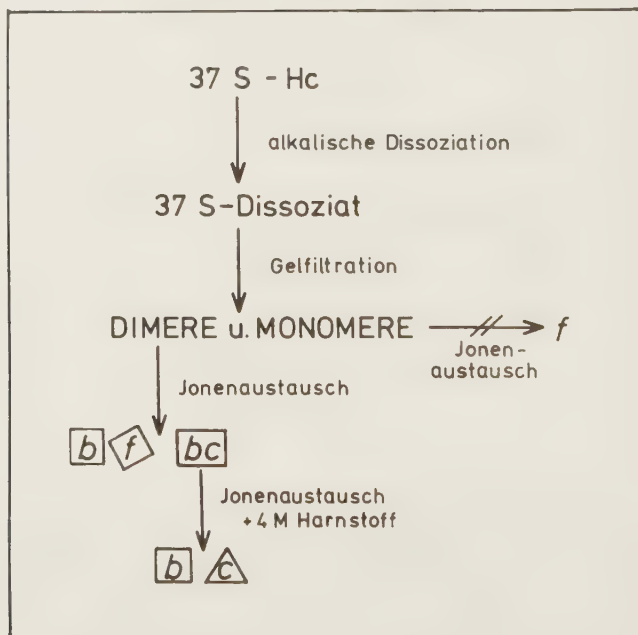
wurde durch die Isolierung so stark geschädigt, daß auch eine sofortige Dialyse gegen harnstoff-freien Puffer nicht verhindern konnte, daß der Kupfergehalt weiter, fast auf Null (1 - 2 % der Theorie) abnahm. Die völlig gleichbehandelte Untereinheit b dagegen zeigte weiterhin einen Kupfergehalt von ≈ 60 % der Theorie (Abb. 15).

Für Funktionsuntersuchungen der Untereinheiten (wie Reassoziationsvermögen, Sauerstoffaffinitätsmessungen etc.) sollte nur die Untereinheit b eingesetzt werden, die bei der Ionenaustauschchromatographie der Dimeren zur Isolierung der Untereinheit f im harnstoff-freien Puffer (Abb. 11, Peak III) anfällt. Die iso-

lierte Untereinheit c kann dagegen nicht mehr zu vergleichenden Funktionsuntersuchungen herangezogen werden.

Die Arbeitsvorgänge zur Isolierung der Untereinheiten b, c und f sind schematisch in Abb. 16 zusammengefaßt. Auch die Eignung der Untereinheiten für weitere Untersuchungen ist angedeutet.

Abb. 16: Schema zur Isolierung der Untereinheiten b, c und f über Ionenaustauschchromatographie. Auf Grund der UV-Spektren und des Kupfergehalts wurden die isolierten Untereinheiten klassifiziert in $\diamond$ = voll funktionsfähig, $\square$ = teilweise funktionsfähig, Δ = denaturiert. Aus dem Monomerenmischung konnte die Untereinheit f nicht isoliert werden.



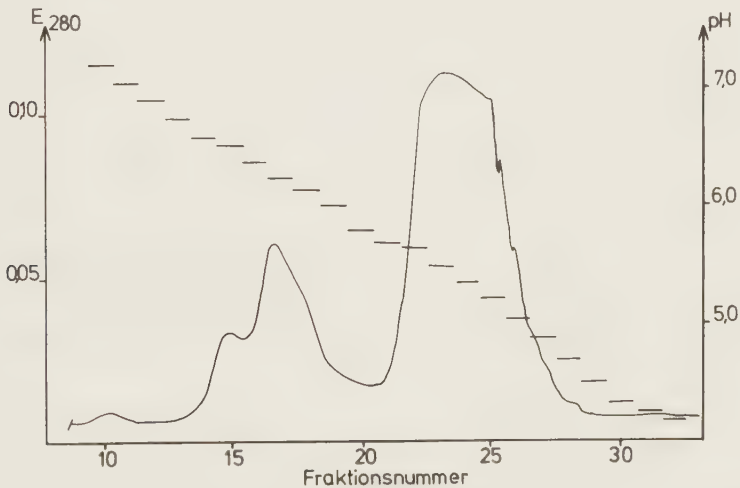
1.5 Isolierung der Untereinheit g

Wie bereits erwähnt, gelang es nicht, Untereinheit f aus dem Monomergemisch ohne Verunreinigung mit anderen Untereinheiten abzutrennen. Bei dem Versuch, die Untereinheiten des Monomergemisches über die Chromatofokussierung aufzutrennen, wurde ein geringer Teil der Untereinheit g (5 - 10 %) ohne jegliche Verunreinigung als erste der Untereinheiten eluiert (Abb. 17).

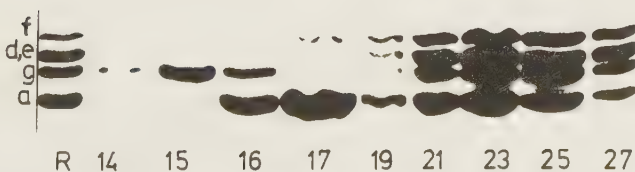
Abb. 17: Chromatofokussierung zur Trennung der Untereinheiten aus dem Monomergemisch. PBE 94-Säule (0.6 x 15 cm), Startpuffer: 0.025 M Imidazol, 2 M Harnstoff, 5 mM EDTA, HCl, pH 7.4; Elutionspuffer: Polybuffer 74 · HCl, 1:8 verdünnt mit 2 M Harnstoff, 5 mM EDTA, pH 4.0; Durchflußgeschwindigkeit 3 ml h⁻¹; linearer pH-Gradient über 24 h; 45-min-Fraktionen.

a) Elutionsprofil bei 280 nm mit den pH-Werten der Fraktionen;
b) SDS-Page (5 - 10 % Acrylamid) einzelner Fraktionen.

a)



b)



2 Chemische und enzymatische Spaltungen der Untereinheit f

2.1 Die Bromcyanspaltung der Kette f

Bei der Sequenzierung großer Polypeptidketten (> 250 Aminosäuren) ist es von entscheidendem Vorteil, zuerst wenige große Spaltprodukte zu isolieren (WALSH et al., 1981, Review; SCHNEIDER et al., 1982). Für die ca. 670 Aminosäuren lange Kette f bot sich als erster Schritt die Bromcyan-Spaltung (GROSS und WITKOP, 1961; GROSS, 1967; AMBLER, 1965) an, bei der die Polypeptidkette spezifisch nach Methioninresten gespalten wird.

Versuche zur präparativen Isolierung von Peptiden nach Spaltung der Untereinheit f mit Bromcyan wurden bereits von SCHNEIDER (1978) durchgeführt; dabei konnten 10 homoserin(lacton)-haltige Peptide im MG-Bereich von 25.000 - 2.500 festgestellt und teilweise charakterisiert werden. Da die Ergebnisse bei öfters wiederholter Spaltung starke Schwankungen zeigten, begann ich mit Versuchen, die Reproduzierbarkeit der BrCN-Spaltung der Kette f zu erarbeiten.

Die Reproduzierbarkeit einer Reaktion setzt voraus, daß immer das gleiche Ausgangsmaterial eingesetzt wird. Diese Voraussetzung wurde durch das vorstehend beschriebene Isolierungsverfahren der Untereinheit f über die Ionenaustauschchromatographie geschaffen. Das Auftreten zahlreicher schwächerer Banden in der SDS-PAGE nach Bromcyanspaltung ließ außerdem vermuten, daß unspezifische Säurespaltungen als Nebenreaktion der BrCN-Spaltung in unerwünschtem Umfang abliefen.

Das Bandenmuster der Kette f nach Spaltung mit Bromcyan zeigte in der SDS-PAGE eine typische Doppelbandenstruktur, die Molekulargewichtsbestimmung ließ drei MG-Bereich unterscheiden: Peptide mit einem MG um 23.000, 15.000 und 6.000 (Abb. 18). Die Summe der Molekulargewichte der in der SDS-PAGE stark gefärbten Banden übertraf mit 88.500 das zu 76.000 bestimmte Molekulargewicht der Kette f (SCHNEIDER et al., 1977) signifikant, ein eindeutiger Hinweis auf die Unvollständigkeit der Spaltung unter diesen Reaktionsbedingungen (Protein gelöst in 70 %iger (v/v)

Abb. 18: Das Bandenmuster nach Spaltung der Kette f mit BrCN; K = Untereinheit f vor der Spaltung; (1) nach 6 h Spaltung bei 37° C; MG-Angaben in Tausend; 10 - 20 % Acrylamid (SDS-PAGE).

Ameisensäure, 70-fach molarer Überschuß an BrCN über Methionin, 6 h Inkubation bei 37° C im Dunkeln unter Stickstoff). Da in der SDS-PAGE nur Peptide mit einer Molmasse ≥ 4.000 Dalton nachweisbar waren, ist die Diskrepanz zwischen der Summe der Spaltprodukte und dem Molekulargewicht der Untereinheit f wahrscheinlich noch größer. Eine Nachspaltung des nach BrCN-Spaltung isolierten Peptidgemisches mit BrCN unter identischen Bedingungen führte zu einer nur geringfügigen Veränderung der Intensität einzelner Banden, wie Abb. 19 zeigt.

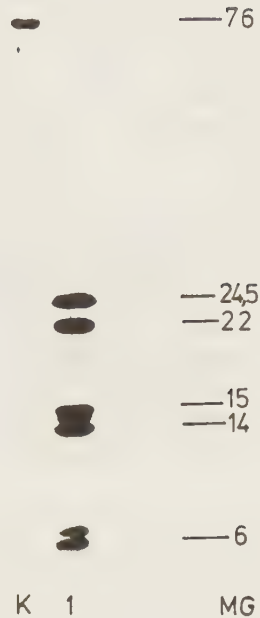
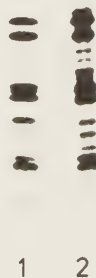


Abb. 19: Vergleich des Bandenmusters der Kette f nach BrCN-Spaltung vor (1) und nach (2) einer Nachspaltung mit BrCN unter identischen Bedingungen; SDS-PAGE (10 - 20 % Acrylamid).

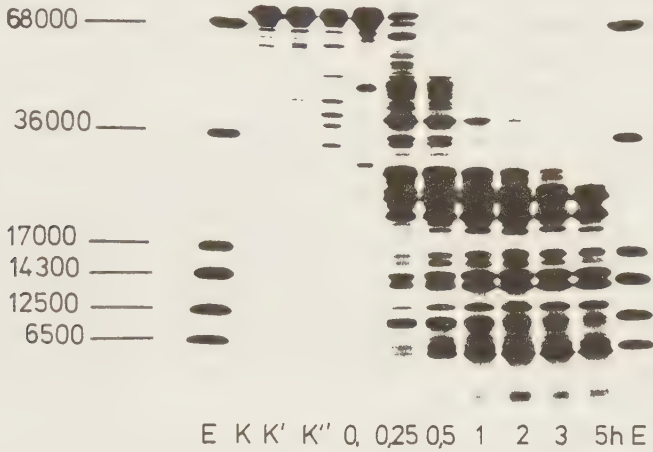


Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Bromcyan-Spaltung der Kette f zeitabhängig bei drei Temperaturen untersucht: bei Raumtemperatur, 37° C und 56° C. Die SDS-PAGE zeigte dabei deutlich das Auftreten von Banden, die während der Spaltung ein Konzentrationsmaximum durchliefen und deshalb als Zwischenstufen anzusehen sind. Auch die unspezifische Säurespaltung wurde in Kontrollversuchen zeitabhängig verfolgt. Diese wurde bei 56° C so stark (Abb. 20c), daß das für die Spaltung der Untereinheit f mit Bromcyan charakteristische Bandenmuster ganz verschwand.

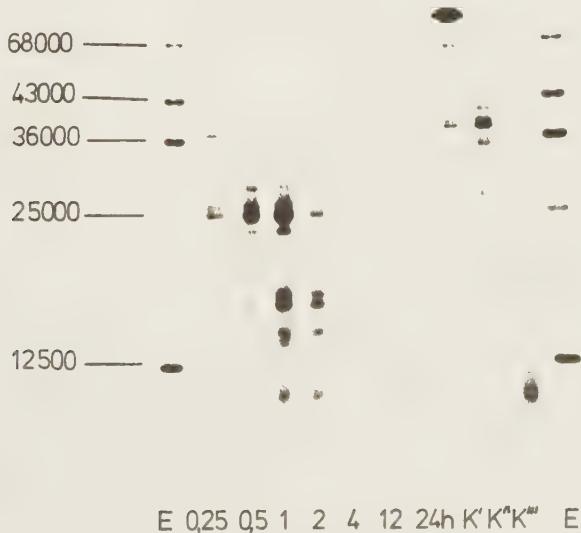
Abb. 20: SDS-PAGE (10 - 20 % Acrylamid) nach Spaltung der Untereinheit f mit BrCN;
a) bei Raumtemperatur; b) bei 37° C und c) bei 56° C;
(a): die Kontrollproben K enthalten die Kette f unter Spaltbedingungen ohne Zusatz von BrCN; K = 0 min; K' = 2 d.



(b): BrCN-Spaltung der Kette f bei 37° C; Untereinheit f vor der Spaltung = K; Kette f für 1 h unter Spaltbedingungen ohne BrCN = K'; Kette f für 5 h unter Spaltbedingungen ohne BrCN = K"; Eichproteine E: Rinderserumalbumin (68.000); Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36.000); Myoglobin (17.000); Lysozym (14.300); Cytochrom c (12.500) und Aprotinin (6.500).



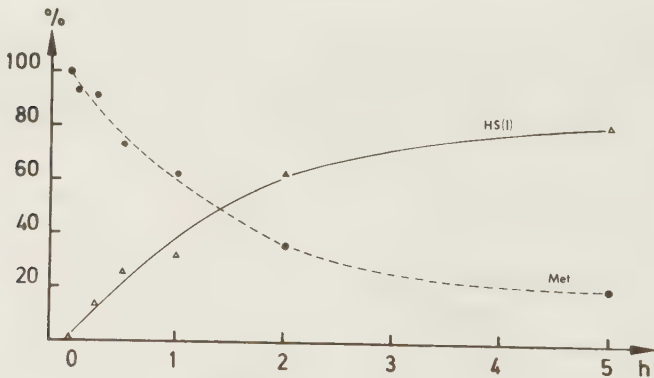
(c): BrCN-Spaltung der Untereinheit f bei 56° C; Untereinheit f unter Spaltbedingungen ohne BrCN-Zugabe: K' nach 30 min, K'' nach 60 min und K''' nach 24 h; Eichproteine E: Rinderserumalbumin (68.000); Ovalbumin (43.000); Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36.000); Chymotrypsinogen (25.000) und Cytochrom c (12.500).



Von den einzelnen Proben der Bromcyan-Spaltung bei 37° C wurden Aminosäureanalysen durchgeführt und die Homoserin(lacton)- bzw. die Methionin-Konzentration verglichen (Abb. 21). Nach 5 h Spaltdauer waren 80 % der Methioninreste der Kette f in Homoserin(lacton) übergeführt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit ließ keine Verbesserung der Spaltausbeute erwarten, wie aus der Abb. 21 zu entnehmen ist.

Abb. 21: Auswertung der Aminosäureanalyse der BrCN-Spaltung der Kette f bei 37° C in Abhängigkeit von der Spaltdauer.

• = Meßwerte für die Methioninkonzentration; Δ = Meßwerte für die Homoserin(lacton)-Konzentration. Die Methioninkonzentration der Kontrolle wurde als 100 % eingesetzt, die gemessenen Methioninkonzentrationen der einzelnen Proben auf diese 100 % bezogen. Der 5 h-Wert der Homoserin(lacton)-Konzentration wurde per Definition als 81 % gesetzt, da die für diese Probe ermittelte Methioninkonzentration 19 % betrug. Die Summe der gemessenen Methionin- und Homoserin(lacton)-Werte betrug für den 15 min-Wert 104 %, für die 30 min-Probe 96 %, für die 60 min-Probe 94 %, für den 120 min-Wert 96 % und für den 5 h-Wert per Definition 100 %.



Obwohl nach Isolierung der Untereinheit f durch Ionenaustauschchromatographie Verunreinigungen durch andere Untereinheiten unter die Nachweisgrenze der SDS-PAGE gesenkt werden konnte, wurden zur Kontrolle die Untereinheit b und c unter den gleichen Bedingungen mit Bromcyan gespalten. Die Analyse der Bandenmuster zeigte, daß im MG-Bereich von 25.000 die Kette b eine sehr starke Bande aufwies. Alle Ketten haben eine starke Bande im MG-Bereich um 6.000 (Abb. 22).

Abb. 22: Vergleich der BrCN-Spaltmuster der Ketten f, b und c; SDS-PAGE, 10 - 20 % Acrylamid; BrCN-Spaltung bei 37° C für 7.5 h. Eichprotein E: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36.000); Myoglobin (17.000) und Aprotinin (6.500).

Isolierung von BrCN-Peptiden

Nach Spaltung von 50 mg der Kette f mit Bromcyan und anschließender Carboxymethylierung der SH-Funktionen wurde das Peptidgemisch über eine Sephacryl S 300 sf-Säule gelchromatographisch aufgetrennt (Abb. 23). Analoge Ergebnisse wurden nach Gelfiltration über Ultrogel AcA 44 unter gleichen Trennbedingungen erzielt.

Nach den Ergebnissen der MG-Bestimmung der einzelnen Banden in der SDS-PAGE (Abb. 20b) enthält Gipfel 1 der Gelfiltration die Peptide des MG-Bereichs um 23.000, Gipfel 2 die um 15.000 und Gipfel 5 die um 6.000 (Abb. 23). Die Fraktionen 3 - 6 (Abb. 23) wurden vereinigt und nach Dialyse gegen 8 M Harnstoff, Tris/HCl, pH 8.0, auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen. Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit einem linearen KCl-Gradienten von 0.0 - 0.2 M KCl im Startpuffer durchgeführt (Abb. 24).

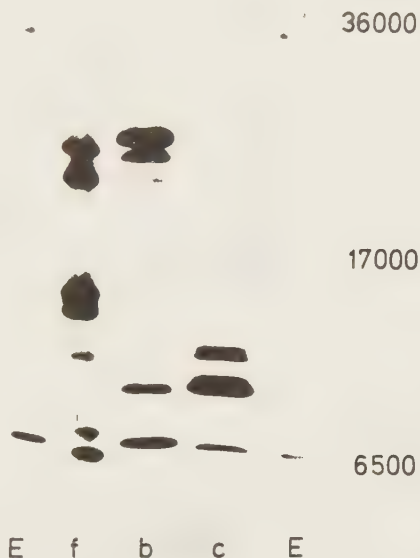
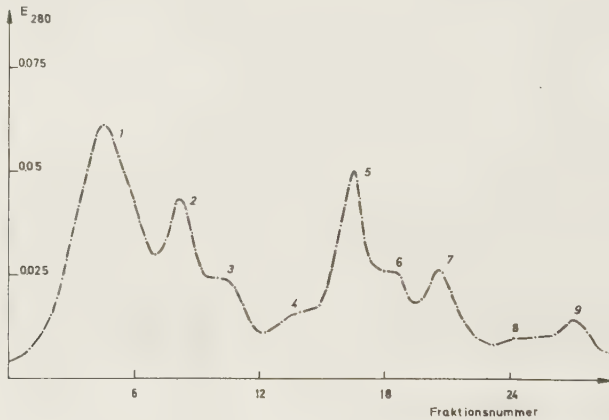


Abb. 23: Trennung des Peptidgemisches nach BrCN-Spaltung der Kette f; Sephacryl S 300 sf (3 x 160 cm) in 8 M Harnstoff/HCl, pH 3.5; Durchflußgeschwindigkeit 8 ml h⁻¹, 1 h-Fraktionen. a) Elutionsprofil bei 206 nm; b) SDS-PAGE einiger Fraktionen (10 - 20 % Acrylamid).

a)



b)

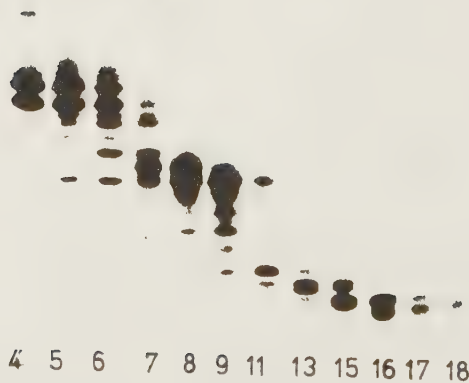
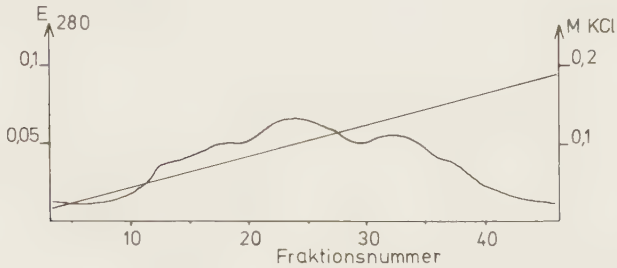


Abb. 24: Trennung des Peptidgemisches mit einem MG um 25.000 über DEAE-Sephacel (0.6 x 15 cm) in 8 M Harnstoff, pH 8.2; a) Elutionsprofil bei 206 nm; b) SDS-PAGE (10 - 20 % Acrylamid) einiger Fraktionen. Die Fraktionen 22 - 25 sowie 32 - 34 wurden vereinigt und proteinchemisch analysiert.

a)



b)



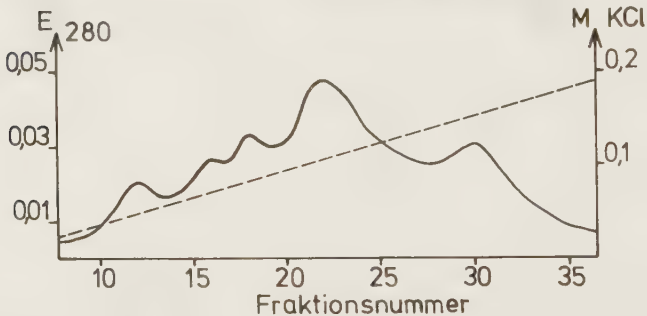
Während das größere der beiden Peptide (Fraktion 22 - 25 von Abb. 24a) in der Aminosäureanalyse neben Homoserin(lacton) auch Methionin enthielt, enthält das kleinere Peptid (Fraktion 32 - 34 von der Abb. 24a) kein Methionin, sondern nur Homoserin(lacton) (Tab. 2b).

Gipfel 2 der Gelfiltration (Abb. 24a) wurde durch HPLC-Chromatographie (UltroPac-Säule von LKB), Kationenaustausch (CM Sepharose CL 6B) oder Anionenaustausch (DEAE-Sephacel) weiter aufgetrennt. Die hochauflösende Gelchromatographie mit der UltroPac-Säule von LKB, ein HPLC-Verfahren, führte nur zu einer guten Abtrennung von Peptidbanden außerhalb des Molekulargewichtsbereichs um 15.000.

Während die Kationenaustauschchromatographie nicht zu einer Auftrennung des Peptidgemisches führte, ergab die Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephacel in 8 M Harnstoff, Tris/HCl, pH 8.2 mit einem linearen Salzgradienten von 0.0 - 0.2 M KCl eine Trennung (Abb. 25). Von den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurden Aminosäureanalysen durchgeführt (Tab. 2b). Das in den Fraktionen 24 - 26 angereicherte Peptid ist das einzige in diesem MG-Bereich, das Homoserin(lacton) enthält (Tab. 2b).

Abb. 25: Trennung der Peptide mit einem MG um 15.000 über DEAE-Sephacel (0.6 x 15 cm) in 8 M Harnstoff, Tris/HCl, pH 8.2; linearer Salzgradient von 0.0 - 0.2 M KCl; Durchflußgeschwindigkeit 3 ml h⁻¹, 60 min-Fraktionen.
a) Elutionsprofil bei 206 nm; b) SDS-PAGE (10 - 20 % Acrylamid) einiger Fraktionen.

a)

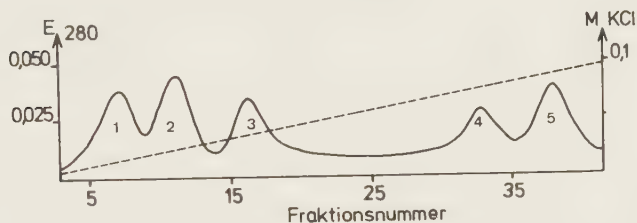


b)



Die Fraktionen 15 - 17 der Gelfiltration (Peak 5 der Abb. 23a) wurden ebenfalls vereinigt und über DEAE-Sephacel in 8 M Harnstoff, Tris/HCl, pH 8.2, mit einem linearen Salzgradienten von 0.0 - 0.1 M KCl getrennt. Fünf Peptide wurden isoliert (Abb. 26); auf Grund der Aminosäureanalyse (Tab. 2b) und der N-Terminus-Bestimmung stellte sich heraus, daß Peptid 2 und 3 sowie 4 und 5 identisch waren.

Abb. 26: Trennung der Peptide mit einem MG um 6.000 über DEAE-Sephacel (0.6 x 15 cm) in 8 M Harnstoff, Tris/HCl, pH 8.2, linearer Salzgradient von 0.0 - 0.1 M KCl; Durchflußgeschwindigkeit 3 ml h⁻¹, 60 min-Fraktionen.



Zur Isolierung von BrCN-Peptiden, die in der SDS-PAGE nicht mehr anfärbbar waren, wurden 50 mg der carboxymylierten Kette f mit BrCN gespalten, und das Peptidgemisch über eine Biogel P 10-Säule, äquilibriert mit 5 % (v/v) Essigsäure, gelchromatographisch getrennt (Abb. 27). Das Eluat zeigte im niedermolekularen Bereich deutlich zwei getrennte Peaks, die weiter analysiert wurden: Fraktion 39 - 41 (Peak 5 von Abb. 27) und Fraktion 46 - 49 (Peak 6 von Abb. 27) wurden lyophilisiert, in 70 %iger (v/v) Ameisensäure gelöst und über HPLC (C₁₈-reversed-phase-Säule) mit einem linearen Acetonitrilgradienten aufgetrennt (Abb. 28).

Abb. 27: Trennung des Peptidgemisches nach BrCN-Spaltung der Kette f über Biogel P 10 (1.5 x 160 cm-Säule) in 5 %iger Essigsäure; 5 ml h⁻¹; 45 min-Fractionen.

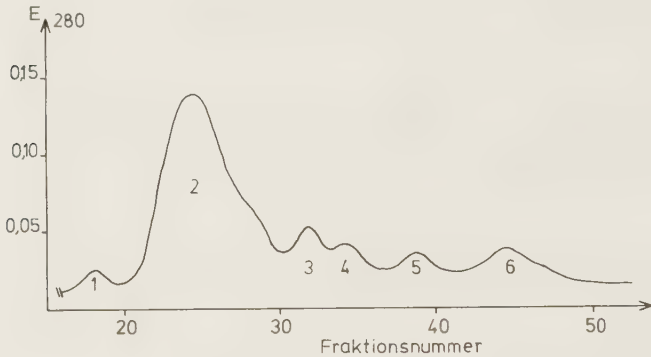
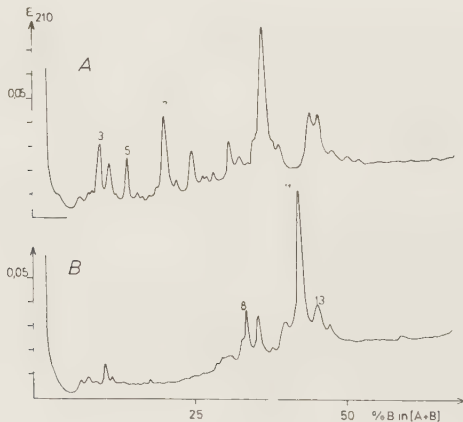


Abb. 28: HPLC-Trennung des Peaks 5 (A) und des Peak 6 (B) der Gelfiltration von Abb. 27; LiChrosorb RP 18, 7 µm; Hibar RT 250-4 Säule (MERCK, Darmstadt); 0.5 M Ammoniumacetatpuffer, pH 6.0 als Puffer A, 70 % Acetonitril in A als Puffer B, linearer Gradient von 0 - 70 % B in (A+B) über 40 min, Durchflußgeschwindigkeit 2 ml min⁻¹.



Die Aminosäureanalyse ergab in den Peptiden Nr. 3, 5 und 7 aus der HPLC-Trennung von Peak 5 bzw. Nr. 8, 11 und 13 von Peak 6 eindeutig Homoserin(lacton) (Tab. 2b).

Die Summe der 11 isolierten Peptide liegt mit 68.500 deutlich unter dem Molekulargewicht der Untereinheit f, das zu 76.000 bestimmt wurde. Der N-Terminus der Untereinheit f wurde mit Thr-Val-Pro-Asp- bestimmt. Damit ist der N-Terminus der Untereinheit nicht in den isolierten BrCN-Peptiden enthalten.

Tab. 2a: Molekulargewichte und N-Termini der isolierten BrCN-Peptide. Bei den mit * angegebenen Aminosäuren waren weitere Aminosäuren als Verunreinigungen erkennbar.

Peptid	MG	N-Terminus
(1)	21.600	Gly* - Pro* - Val* -
(2)	13.300	Pro* - Ile/Leu* -
(3)	4.800	Ala - Arg - Lys - Ile/Leu -
(4)	5.400	Ile/Leu - Pro - Phe - Ser - Asn - Phe -
(5)	5.600	Ser - Gly - Gly* -
(6)	3.700	Ala - Ser -
(7)	4.100	Gly - Leu -
(8)	3.400	Pro - Asp - Gly -
(9)	2.100	Pro - Gly* -
(10)	2.500	Ile/Leu - Tyr -
(11)	2.000	Asp - Phe - Ile/Leu -

Tab. 2b: Aminosäurezusammensetzung der isolierten BrCN-Peptide von Tab. 2a. Cystein und Tryptophan wurden nicht bestimmt. Die Methionin-Konzentration wurde per Definition zu 1 gesetzt. Die obere Zeile gibt die berechneten Aminosäurewerte pro Molekül an, die untere Zeile die auf ganzzahlige Aminosäurereste pro Molekül gerundeten Werte.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
D	22.3 22	11.8 12	4.9 5	6.7 7	6.2 6	1.8 2	3.3 3	2.4 2	1.9 2	2.0 2	3.1 3
T	14.7 15	10.4 10	0.1 -	2.6 3	2.1 2	2.3 2	1.7 2	0.2 -	0.1 -	0.7 1	1.1 1
S	13.3 13	8.1 8	1.6 2	3.7 4	3.2 3	1.6 2	4.2 4	2.1 2	0.7 1	0.9 1	2.3 2
E	22.7 23	15.2 15	3.2 3	2.9 3	3.1 3	6.3 6	3.8 4	2.2 2	2.3 2	2.9 3	2.2 2
P	9.4 9	4.9 5	0.2 -	0.9 1	0.8 1	0.1 -	0.1 -	2.7 3	?	0.2 -	0.1 -
G	12.1 12	9.3 9	2.7 3	3.2 3	3.0 3	5.8 6	5.2 5	5.3 5	1.7 2	2.1 2	2.3 2
A	12.8 13	6.3 6	2.1 2	2.0 2	2.7 3	2.7 3	4.9 5	4.1 4	0.9 1	1.3 1	0.8 1
V	9.7 10	9.1 9	3.2 3	3.3 3	3.9 4	0.2 -	0.1 -	0.4 -	1.5 2	2.1 2	1.9 2
M*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	19.3 19	10.4 10	2.7 3	2.1 2	1.9 2	2.0 2	0.2 -	0.1 -	0.0 -	0.1 -	0.8 1
L	7.7 8	6.3 6	5.1 5	6.1 6	2.9 3	3.1 3	2.9 3	1.7 2	2.0 2	3.2 3	2.1 2
F	5.2 5	3.9 4	1.7 2	2.6 3	2.1 2	0.3 -	0.4 -	4.6 5	0.1 -	0.3 -	1.3 1
Y	9.2 9	6.3 6	3.1 3	1.8 2	1.9 2	0.2 -	4.2 4	0.3 -	2.1 2	2.8 3	0.2 -
K	6.3 6	6.8 7	0.8 1	3.3 3	6.2 6	3.4 3	1.9 2	2.8 3	1.2 1	0.1 -	?
H	11.4 11	5.2 5	5.4 5	1.9 2	3.1 3	2.1 2	2.2 2	0.3 -	1.1 1	1.2 1	?
R	14.8 15	5.0 5	2.3 2	2.2 2	4.3 4	1.8 2	1.9 2	2.1 2	1.1 1	1.0 1	?

2.2 Die unspezifische Säurespaltung

Außer mit Bromcyan wurde die Kette f auch mit o-Jodosobenzoessäure und mit Ameisensäure chemisch gespalten. Die Spaltung mit o-Jodosobenzoessäure, die spezifisch nach Tryptophanresten die Polypeptidkette spaltet, führte zu keinen in der SDS-PAGE anfärbbaren Abbauprodukten, nur noch eine schwache Bande in Höhe des Ausgangsmaterials war im Gel zu erkennen.

Die Säurespaltung führte zu vielen Spaltprodukten unterschiedlicher Molekulargewichte. Die Kette f wurde in Ameisensäure bei 56° C inkubiert, wobei Inkubationszeit und Säurekonzentration variiert wurden. Die SDS-PAGE (Abb. 29) zeigte, daß nach 4 stündiger Inkubation in 70 %iger (v/v) Ameisensäure Peptide der Größen um 16.000, 20.000, 25.000, 31.000 und 36.000 entstanden waren.

Abb. 29: Säurespaltung der Kette f in Abhängigkeit zur Säurekonzentration (17.5 %, 35 % und 70 % Ameisensäure) und der Inkubationszeit (2, 4, 6h). SDS-PAGE (10 - 20 % Acrylamid), Eichproteine E: Rinderserumalbumin (68.000), Ovalbumin (43.000) und Cytochrom c (12.500).

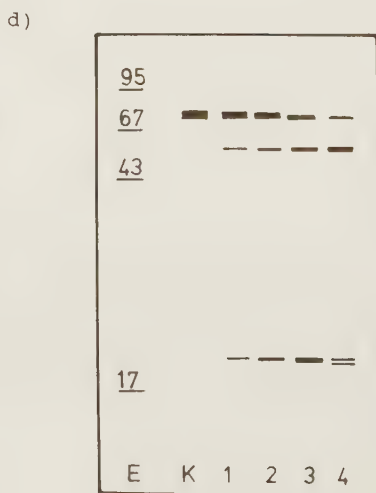
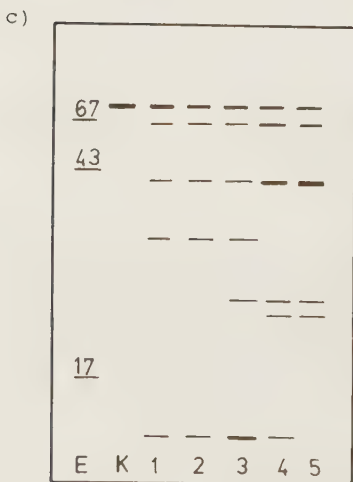
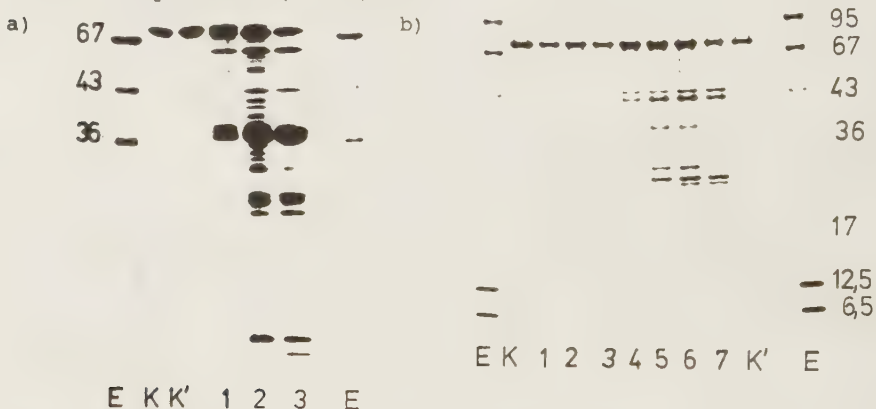


2.3 Enzymatische Spaltungen der Untereinheit f

Ausgangspunkt der erfolgreichen Sequenzierung der beiden Untereinheiten d und e war die limitierte Proteolyse dieser Untereinheiten mit Trypsin bzw. Chymotrypsin: bei der Untereinheit e führte die Inkubation der nativen Untereinheit mit Chymotrypsin zur Spaltung in ein 42.000 Dalton- und ein 28.000 Dalton-Peptid

(SCHNEIDER et al., 1981). Die Spaltung der Untereinheit d mit Trypsin machte die Isolierung zweier Molekülhälften mit einem Molekulargewicht von 37.000 und 34.000 möglich (SCHARTAU et al., 1983a). Die Untereinheit f wurde undenaturiert mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin und der Staphylococcus aureus-Protease gespalten; die Reaktionen wurden zeitabhängig in der SDS-PAGE (Abb. 30a-d) verfolgt.

Abb. 30: limitierte Proteolyse der Untereinheit f durch a) Trypsin: 1 = 30 min, 2 = 2 h, 3 = 5 h; b) Chymotrypsin: K = Kontrolle, 1 = 1 min, 2 = 5 min, 3 = 15 min, 4 = 30 min, 5 = 1 h, 6 = 2 h, 7 = 3 h, K' = Kontrolle 3 h unter Spaltbedingungen ohne Protease; c) Subtilisin: K = Kontrolle, 1 = 15 min, 2 = 30 min, 3 = 1 h, 4 = 2 h, 5 = 4 h; d) Staphylococcus aureus-Protease: K = Kontrolle, 1 = 1 h, 2 = 2 h, 3 = 4 h, 4 = 24 h; Eichproteine (E): 95 = Phosphorylase a (95.000); 67 = Rinderserumalbumin (67.000); 43 = Ovalbumin (43.000); 36 = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36.000); 17 = Myoglobin (17.000); 12.5 = Cytochrom c (12.500) und 6.5 = Aprotinin (6.500).



Zur präparativen Isolierung eines Peptids mit ca. 37.000 Dalton ist eine auf 5 Stunden beschränkte Spaltung mit Trypsin geeignet, während die Inkubation der Untereinheit f mit Chymotrypsin und mit Subtilisin wenig erfolgversprechend verlief. Die Spaltung mit der Staphylococcus aureus-Protease führt zu einem 50.000 Dalton- und einem 20.000 Dalton-Peptid. Zur Gewinnung des großen Spaltproduktes ist eine Inkubationszeit von 24 Stunden besonders geeignet.

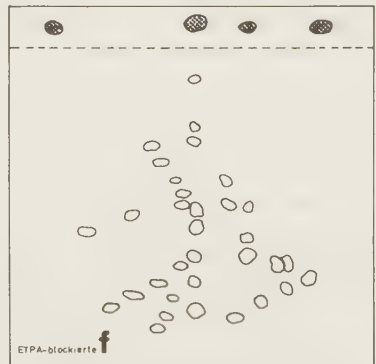
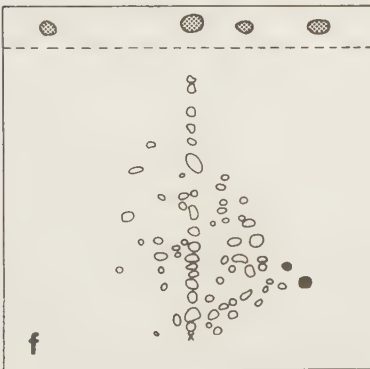
Tryptischer Fingerprint der Untereinheit f

Die reduzierte und carboxymethylierte Untereinheit f wurde mit Trypsin gespalten (bei 37° C, über 18 h). Das Peptidgemisch wurde zweidimensional nach PERHAM und BATES (1967) dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Fluorescamin angefärbt. Der Fingerprint zeigt 67 Peptid/Aminosäureflecken (Abb. 31a, STRYCH, 1981). Wurden die Lysinreste der carboxymethylierten Unterein-

Abb. 31: Tryptischer Fingerprint der carboxymethylierten Kette f. Auftrennung der Peptide nach PERHAM und BATES (1967): 1. Dimension: Elektrophorese in Pyridin:Eisessig:Wasser = 25:1:225, pH 6.5 (500 V, 18-20 mA, 100 min; Anode links); 2. Dimension: n-Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1; gestrichelte Linie: Lösungsmittelfront; gepunktete Flecken: Asp, Gly, His, Lys (von links nach rechts); die zwei schwarzen Flecken entsprechen Arg und Lys.
a) Fingerprint vor, b) nach Modifikation der Lysinreste mit ETPA.

a)

b)



heit f vor der Trypsinolyse mit ETPA blockiert (Reaktions-
schema S. 15), so verringerte sich die Fleckenanzahl von
67 auf 32 (Abb. 31b). Die spezifische Modifikation der Lysin-
reste der Untereinheit f durch Reaktion mit ETPA führt damit
bei der Trypsinolyse zu einer Verringerung der Peptidanzahl
um mehr als 50 %.

3 Kupferbestimmung hämocyandinhaltiger Lösungen

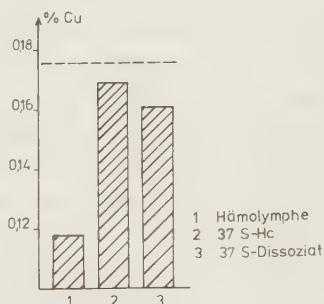
Kupfer wird als zweiwertiges Kation unspezifisch von Hämocyanin gebunden: eine 37 S-Hämocyaninlösung in Tris/HCl, pH 8.0 zeigte nach Dialyse gegen Cu(II)-haltigen Puffer (10 mM CuSO_4 in Tris/HCl, pH 8.0) und anschließender Dialyse gegen Cu(II)-freiem Puffer mit 132 % Kupfer (gegenüber 100 % der Kontrolle) eine deutlich erhöhte Kupferkonzentration. Eine unspezifische Cu(II)-Adsorption des Proteins war auch dann zu beobachten, wenn durch Denaturierung das Hämocyanin sein im aktiven Zentrum gebundenes Kupfer verloren hatte: die dabei freigesetzten Kupferionen blieben zum Großteil am Protein. So wurde nach Inkubation der Untereinheit f in 8 M Harnstoff nach 18 stündiger Dialyse mit zweifachem Pufferwechsel der Kupfergehalt des Proteins zu 86 % der Theorie bestimmt. Erst die Dialyse gegen EDTA-haltigen Puffer (5 mM EDTA) führte zu einer deutlichen Abnahme des Kupfergehalts, der zu 11 % der Theorie bestimmt wurde. Die im aktiven Zentrum komplexierten Cu(I)-Ionen werden durch EDTA nicht entfernt. Dieses gilt auch für oxygeniertes Hämocyanin: das sauerstoffbeladene Cu(II) ist nicht EDTA-komplexierbar, wie es die Kupferbestimmung oxygenierter Hämocyaninlösungen vor und nach Inkubation mit EDTA zeigt: Untereinheit f im Bicarbonatpuffer, pH 9.6 wurde gegen 5 mM EDTA (im Bicarbonatpuffer, pH 9.6) dialysiert. Die gemessene Kupferkonzentration lag mit 90.6 % vor und 91.3 % nach der EDTA-Dialyse im Fehlerbereich der Messung (% Kupfer bezogen auf den theoretischen Wert). Aus diesen Gründen wurde der Kupfergehalt einer Proteinlösung erst nach Dialyse gegen EDTA und Entfernung des EDTAs (durch Dialyse oder Gelfiltration) gemessen.

3.1 Kupferverlust bei der Isolierung des Hämocyanins

Für das 37 S-Hämocyanin läßt sich ein Kupfergehalt von 0.176 % unter folgenden Annahmen berechnen: (1) der Mittelwert der Molekulargewichte der 24 Untereinheiten (bei einer Zusammensetzung von 4a, 2b, 2c, 4d, 4e, 4f, 4g) beträgt 72.000; (2) jede Untereinheit enthält 2 Kupferionen. Bei den Kupferanalysen mit der

flammenlosen Atomabsorptionsspektroskopie wurde für das 37 S-Hc ein Kupfergehalt von $0.165 \pm 0.004 \%$ ($n = 8$) gefunden, das sind 94 % der Theorie. Nach den einzelnen Isolierungsschritten wurden Kupfer- und Proteinmenge bestimmt. Der Anstieg der Kupferkonzentration bei der Isolierung des 37 S-Hämocyanins aus der zellfreien Hämolymphe zeigt, daß 70 % der Hämolymphe-Proteine durch das 37 S-Hc gestellt werden. Die Abnahme des Kupfers bei der alkalischen Dissoziation des 37 S-Moleküls in Monomere und Dimere von 0.169 auf 0.161 % war gering (Abb. 32).

Abb. 32: Kupferkonzentration der Hämolymphe, des 37 S-Hämocyanins und des 37 S-Dissoziats in Gew.-% der eingesetzten Proteinmenge;  Meßwerte (Mittelwerte dreier Meßreihen); ---theoretischer Kupfergehalt von 37 S-Hc.



Wurde bei einer Aufarbeitung nach Auftrennung des 37 S-Dissoziats in Monomere und Dimere die Kupferkonzentration in jeder Fraktion des Eluats der Gelfiltration bestimmt (Abb. 33), so lagen die Werte der Dimerenfraktion um 16 % unter denen der Monomeren. Das mittlere Molekulargewicht der Dimeren-Untereinheiten (bei einer Untereinheitenzusammensetzung von 2b, 2c, 2.5f) ist mit 72.000 praktisch gleich dem mittleren Molekulargewicht der Monomeren-Untereinheiten (bei einer Untereinheitenzusammensetzung von 4a, 4d, 4e, 1.5f, 4g) mit 71.900. Das zeigt, daß die bei der alkalischen Dissoziation des 37 S-Hämocyanins meßbare Kupferabnahme auf einen Kupferverlust bei den Dimeren zurückgeht. In den Abb. 33 und 34 sind die Kupferanalysen der einzelnen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung der Untereinheiten a, d und e sowie zur Isolierung von f, b und bc aus dem Dimerengemisch aufgetragen.

Abb. 33: Kupferkonzentration (--- in % der Theorie) der Fraktionen einer gelchromatographischen Dimeren-Monomeren-Trennung. Bedingungen der Gelfiltration nach SCHNEIDER, 1978.

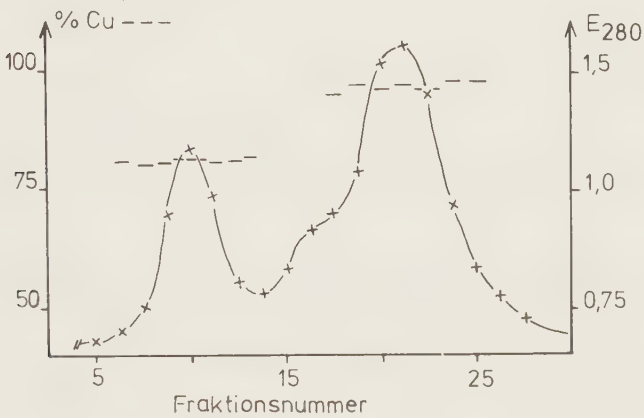
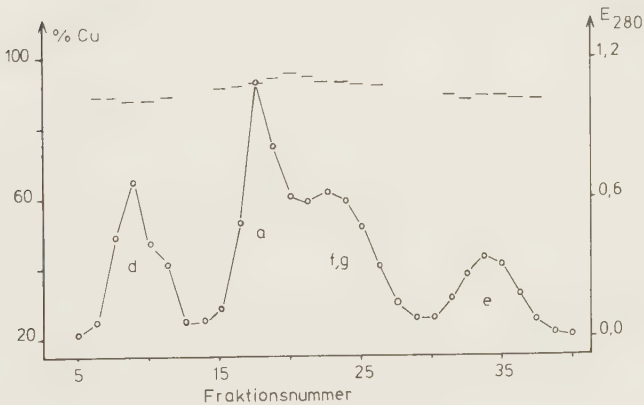


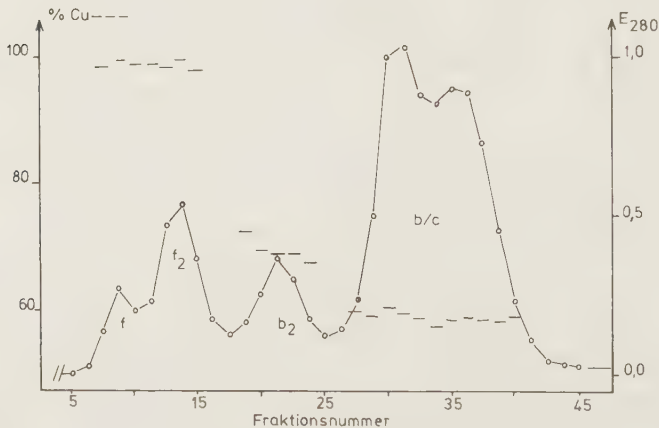
Abb. 34: Kupfergehalt (in % der Theorie) der einzelnen Fraktionen des Ionenaustausches zur Trennung der Monomeren.



Während die einzelnen Fraktionen der Monomerentrennung ein fast konstantes Kupfer-Protein-Verhältnis von ca. 95 % der Theorie zeigten (bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte der einzelnen Untereinheiten) hatten von den Dimeren nur die f-haltigen Fraktionen mit ca. 96 % der Theorie einen vergleichbar hohen Kupfergehalt (Abb. 35). Für die Fraktionen der Untereinheit b wurden nur 74 % der Theorie gemessen.

Zur Klärung der Frage, welche der Untereinheiten des Heterodimers bc bei der Isolierung besonders viel Kupfer verliert, wurde ein Ionenaustausch durchgeführt (Bedingungen wie unter Abb. 11 beschrieben, Salzgradient von 0.075 - 0.4 M NaCl) und einzelne Fraktionen auf Kupfer analysiert. Auf Grund dieser Ergebnisse (Abb. 35) ließ sich zeigen, daß besonders die Untereinheit c Kupfer verliert. Wurden die Untereinheiten b und c aus dem bc-Peak durch Ionenaustauschchromatographie in 4 M Harnstoff (siehe S. 33) einzeln isoliert und anschließend der

Abb. 35: Kupfergehalt (in % der Theorie) der Gipfelbereiche der Untereinheiten nach Ionenaustauschchromatographie der Dimeren.



Kupfergehalt der getrennten Untereinheiten bestimmt, so wurde bei verschiedenen Aufarbeitungen für die Untereinheit b ein Kupfergehalt von 62 % der Theorie (Mittelwert aus 5 Bestimmungen) gefunden, während der Maximalwert für die Untereinheit c bei 46 % der Theorie lag (Tab. 3). Besonders auffallend waren die stark streuenden Ergebnisse für die Untereinheit c: bei sofortiger Analyse - vor einer weiteren Dialyse - wurden die "hohen" Kupferwerte um 45 % der Theorie gefunden. Nach Dialyse gegen Harnstoff-freien Puffer lag nur noch apo-c vor (Aufarbeitung 2 und 6 der Tab. 3). Dabei fiel Untereinheit c mikrokristallin (Seidenglanz) aus (Abb. 36).

Tab. 3: Kupfergehalt (in % der Theorie) des Heterodimers bc und der durch Dissoziation in 4 M Harnstoff getrennten Untereinheiten b und c; n.b. = nicht bestimmt.

Aufarbeitung	bc	b	c
1	n.b.	58 %	44 %
2	67 %	57 %	2 %
3	n.b.	65 %	46 %
4	66 %	n.b.	n.b.
5	n.b.	63 %	29 %
6	n.b.	64 %	1 %

Abb. 36: Kristalle der Untereinheit c (Aufarbeitung 2 der Tab. 3; Vergrößerung 100x; Photo: Dr. Bohn, Zoologisches Institut der Universität München.



3.2 Der Kupfergehalt von Hämocyaninlösungen nach Einwirkung denaturierender Agenzien

Die Inkubation von *Murex trunculus*-Hämocyanin mit 8 M Harnstoff oder 4 M Guanidiniumhydrochlorid führt zu einer beinahe vollständigen Entkupferung des Proteins (WOOD et al., 1968). Auch beim 37 S-Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* bzw. den Hämocyanin-Untereinheiten ist die Denaturierung des Proteins durch Inkubation mit 2 % SDS, 6 M Guanidiniumhydrochlorid oder 8 M Harnstoff mit einer fast quantitativen Kupferabgabe verknüpft (Tab. 4).

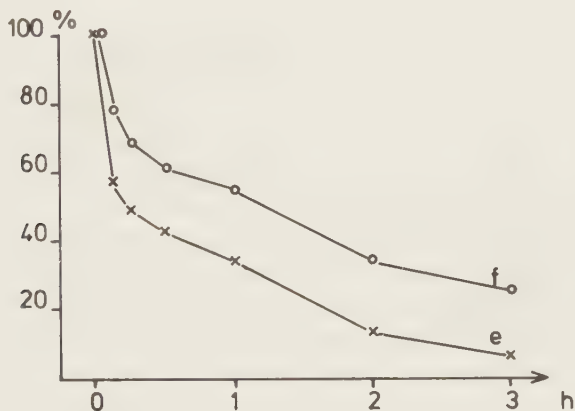
Tab. 4: Kupferbestimmung nach Dialyse der Untereinheit f gegen verschiedene denaturierende Agenzien. Die bei der Kontrolle (Dialyse gegen $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1) gemessene Kupferkonzentration (Kupfergehalt in % der Theorie) betrug 98.6 %.

Probe	denaturierendes Agens	Kupfergehalt
(1)	2 % SDS in $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1	4.1 %
(2)	8 M Harnstoff in $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1	10.8 %
(3)	6 M Guanidiniumhydrochlorid in $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1	3.4 %
(4)	70 % Ameisensäure	11.9 %

Von allen Proben wurden UV-Spektren von 240 - 400 nm angefertigt, keine der Proben zeigte dabei auch nur eine Andeutung einer 340 nm-Bande, so daß auch die Proben mit einem Kupfergehalt von über 10 % (Probe (2) und (4) der Tab. 4) keinen Sauerstoff mehr binden.

Der Einfluß von Harnstoff auf die Stabilität des Kupfer-Protein-Komplexes wurde eingehend untersucht. Die Zeitabhängigkeit der Kupferabgabe isolierter Untereinheiten in 8 M Harnstoff bei Raumtemperatur ist in Abb. 37 wiedergegeben. Beim Vergleich der Untereinheiten e und f wurde ein geringfügiger quantitativer Unterschied nach 24 h in 8 M Harnstoff, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1 gemessen: für Untereinheit e wurden 2 %, für Untereinheit f 11 % Restkupfer gefunden.

Abb. 37: Zeitabhängigkeit der Kupferabgabe der Untereinheit e (x) und f (o) in 8 M Harnstoff, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1 bei Raumtemperatur



Von besonderem Interesse (unter dem Aspekt der Isolierung kupferhaltiger Peptide nach limitierter Proteolyse) war die Frage, ob die Rate des Kupferverlustes linear mit der Harnstoffkonzentration ansteigt, oder ob es erst ab einer bestimmten Harnstoffkonzentration zu einer meßbaren Freisetzung des Kupfers kommt. Hierzu wurde 37 S-Hämocyanin in Tris/HCl, pH 8.0 für 16 Stunden bei Raumtemperatur verschiedenen Harnstoffkonzentrationen ausgesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Abb. 38 a-c wiedergegeben. Bis zu einer Harnstoffkonzentration von 4 M ist kein starker Kupferverlust meßbar, wie Abb. 38a zeigt.

Abb. 38a: Abnahme der Kupferkonzentration von 37 S-Hämocyanin bei der Dialyse gegen verschiedene Harnstoffkonzentrationen.

○ = Kupfergehalt;
● = Quotient aus der Absorption bei 280 und 340 nm.

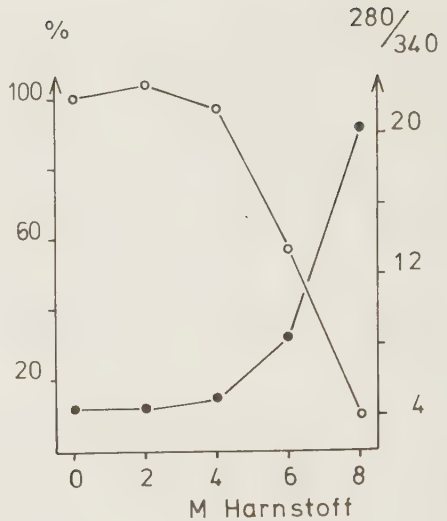


Abb. 38b: UV-Spektren der einzelnen Proben. Das UV-Spektrum der gegen 2 M Harnstoff dialysierten Probe ist identisch mit dem UV-Spektrum der Kontrolle.

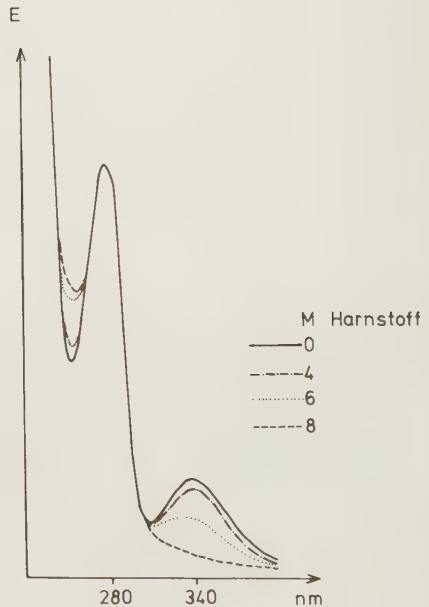


Abb. 38c: PAGE (3.7 % Acrylamid)
der einzelnen Proben von Abb. 38a.



Erst bei Harnstoffkonzentrationen größer 4 M wird Kupfer vom Hämocyanin freigesetzt (die besonders starke Labilität der Untereinheit b und vor allem c wurde im letzten Kapitel bereits besprochen). Die UV-Spektren der einzelnen Proben (Abb. 38b) zeigen, daß Harnstoffkonzentrationen bis einschließlich 4 M die Funktion des aktiven Zentrums mit Ausnahme des Heterodimers bc nicht beeinträchtigen. Eine deutliche Abnahme der Sauerstoffbindung ist erst ab Harnstoffkonzentrationen zu beobachten, bei denen das Hämocyanin das Kupfer verliert. Der Einfluß der verschiedenen Harnstoffkonzentrationen auf die Quartär- und Tertiärstruktur des 37 S-Hämocyanins und der Untereinheiten wurde parallel zur Kupferbestimmung in der PAGE verfolgt (Abb. 38c). So wurde deutlich, daß eine Harnstoffkonzentration ab 4 M die Quartärstruktur des 24mers zerstört: das 37 S-Molekül zerfällt vor allem in Hexamere. Erst bei Harnstoffkonzentrationen größer 4 M wurde eine Denaturierung der Untereinheiten in der PAGE sichtbar.

Ein Vergleich der sieben Untereinheiten des *Eurypelma californicum* Hämocyanins in Bezug auf die Abnahme der Kupferkonzentration nach 18-stündiger Dialyse gegen 4 M Harnstoff bringt Tab. 5.

Tab. 5: Kupfergehalt der einzelnen Untereinheiten des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* nach Dialyse (18 h) gegen 4 M Harnstoff, Tris, HCl, pH 8.0

Untereinheit	% Cu Kontrolle	% Cu Probe
a	93.2	88.7
b	-	57.3
c	-	2.1
d	86.9	85.8
e	88.3	86.5
f	97.3	92.4
g	85.1	83.8

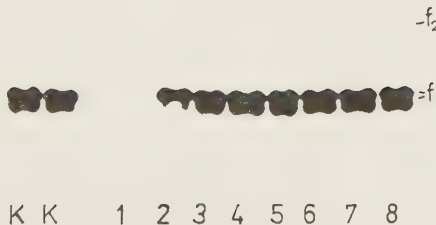
Bei der Behandlung der Untereinheit a mit 4 M Harnstoff wurde in einem zusätzlichen Versuchsansatz der Harnstofflösung 5 mM β -Mercaptoäthanol zugesetzt. Dieses führte nur zu einer geringfügigen zusätzlichen Kupferabnahme (Tab. 6). Ist die Wirkung von β -Mercaptoäthanol auf die Kupferkonzentration der Untereinheit a nur gering, so führt der Zusatz von 5 mM β -Mercaptoäthanol zu einer fast quantitativen Abnahme der Sauerstoffbindungsfähigkeit des Proteins.

Tab. 6: Untereinheit a, Abhängigkeit der Kupferkonzentration von β -Mercaptoäthanol.

Dialyseflüssigkeit	% Cu
Tris, HCl, pH 8.0	93.2
4 M Harnstoff, Tris, HCl, pH 8.0	88.7
5 mM β -Mercaptoäthanol, Tris, HCl, pH 8.0	87.8
4 M Harnstoff, 5 mM β -Mercaptoäthanol, Tris, HCl, pH 8.0	83.5

Die denaturierende Wirkung höherer Konzentrationen von β -Mercaptoäthanol auf das Hämocyanin zeigt Abb. 39 am Beispiel der Untereinheit f. Im Gel der PAGE (ohne Zusatz von SDS) sind für die Untereinheit f drei Banden charakteristisch: für das Homodimer f_2 eine kürzer wandernde und für die monomere f zwei, die als Doppelbande auftreten (Diskussion S. 93). Wird Untereinheit f mit verschiedenen Konzentrationen von β -Mercaptoäthanol inkubiert, so wird im Gel deutlich: höhere Konzentrationen (> 0.1 M) von β -Mercaptoäthanol (Abb. 39, 1 und 2) verhindern eine Ausbildung scharfer Proteinbanden im Gel, es kommt zum Auftreten diffuser, gefärbter Gelbereiche, charakteristisch für denaturiertes Protein. Erst β -Mercaptoäthanolkonzentrationen ≤ 0.1 mM (Abb. 39, 5, 6, 7 und 8) beeinflussen die (für native Untereinheiten typischen) scharfe Proteinbandenbildung nicht.

Abb. 39: PAGE (5 - 10 % Acrylamid) der Untereinheit f (im Bikarbonatpuffer, pH 9.6) unter Zusatz von unterschiedlichen β -Mercaptoäthanolmengen: K = Kontrolle, 1 = 1.4 M, 2 = 0.14 M, 3 = 14 mM, 4 = 1.4 mM, 5 = 0.14 mM, 6 = 14 μ M, 7 = 1.4 μ M, 8 = 0.14 μ M β -Mercaptoäthanol im Bikarbonatpuffer, pH 9.6. Durch Diffusion von β -Mercaptoäthanol aus der Probe 1 zeigt die direkt daneben liegende Kontrolle einseitig ebenfalls das für denaturiertes Protein typisches "Verschmieren" anfärbbarer Bereiche über die Laufstrecke.



3.3 Darstellung von apo-Hämocyanin

In Zusammenarbeit mit B. KEMPTER (1983) wurde untersucht, ob bei der Entfernung des Kupfers aus Hämocyanin-Untereinheiten immunologisch faßbare Änderungen der Tertiärstruktur auftreten.

Zur schonenden Darstellung von apo-Hämocyanin werden allgemein Cyanid-Ionen aus Cu(I)-Komplexliganden eingesetzt. Bereits 1903 beschrieb KOBERT den Einfluß von verdünnter Kaliumcyanidlösung auf die Kraken-Hämolymph: nach Cyanid-Zusatz trat eine sofortige Entfärbung der Hämolymph ein. KUBOWITZ (1938) wies nach, daß die Cyanidbehandlung von *Octopus vulgaris*-Hämocyanin zu einer fast vollständigen Entkupferung des Proteins führte. Außer der Komplexbildung der Cu(I)-Ionen (sowie bei sehr niedrigen Cyanidionenkonzentrationen eine Verdrängung des Sauerstoffs aus dem aktiven Zentrum, DE LEY und LONTIE, 1972) sind keine weiteren Reaktionen, die eine Tertiärstrukturänderung des Proteins hervorrufen könnten, beschrieben worden (ZOLLA et al., 1983).

Die Freisetzung des Kupfers aus oxygeniertem 37 S-Eurypelma californicum Hämocyanin erfolgt bei Raumtemperatur in wenigen Minuten (eingesetzte Cyanidkonzentration von 50 mM gegenüber einer Kupferkonzentration von 70 μ M). Wie die Abb. 40 zeigt, führt eine Cyanidkonzentration von 5 mM zu keiner meßbaren Abnahme der 340 nm-Absorption; die Abnahme der 340 nm-Absorption bei Einwirkung einer 50 mM Cyanidkonzentration ist auf die Entkupferung des Proteins zurückzuführen, wie die Kupferbestimmung mit der Atomabsorptionsspektroskopie ergab (Abb. 41).

Die Behandlung von Hc-Lösungen mit 50 mM Cyanid bei Raumtemperatur führte bei allen Hämocyanin-Proben innerhalb von 10 min zu einem praktisch quantitativen Entzug des Kupfers: der nach Isolierung des apo-Hämocyanins noch meßbare Kupfergehalt lag zwischen 1 - 3 % (gegenüber 100 % der Kontrollprobe). Die aktiven Zentren der einzelnen Untereinheiten werden durch die Cyanid-Zugabe unterschiedlich schnell inaktiviert: während die Untereinheit a 30 sec nach Einstellung der Lösung auf 50 mM CN^- noch eine 340 nm-Absorption von 47 % gegenüber der Ausgangsabsorption zeigt, ist die 340 nm-Absorption der Untereinheit e bereits auf 1 % zurückgegangen (Abb. 42).

Abb. 40: Messung der Absorption bei 340 nm einer oxygenierten 37 S-Hämocyandinlösung in einer 5 mM CN^- (---•---) und einer 50 mM CN^- -Lösung (—•—) in Tris, HCl, pH 8.0; die Kupferkonzentration der Lösung betrug 70 μM .

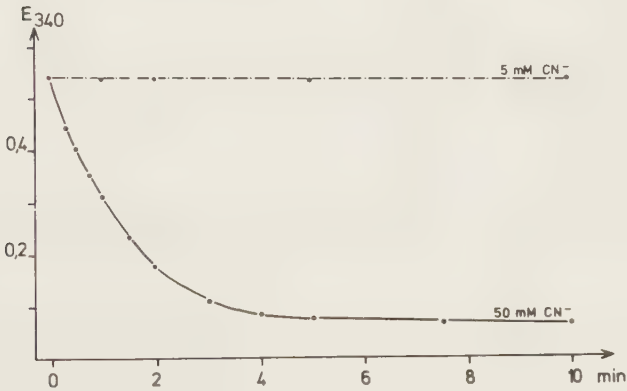


Abb. 41: Bestimmung der Kupferkonzentration im Eluat der Gelfiltration einer 10 min mit 50 mM CN^- inkubierten 37 S-Hämocyandinprobe. Gelfiltration über Trisacryl GF05 in Tris, HCl, pH 8.0, 20 μl jeder Fraktion wurde zur Kupferbestimmung in der Atomabsorptionsspektroskopie eingesetzt.

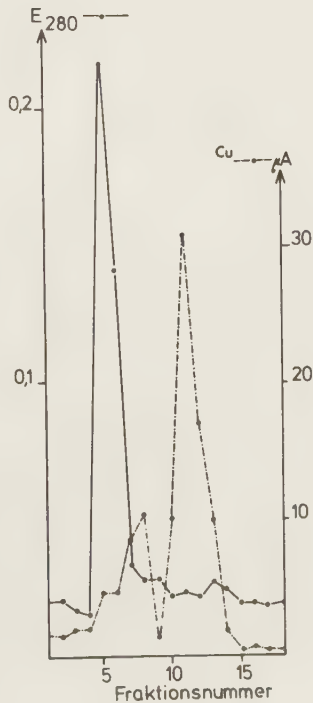
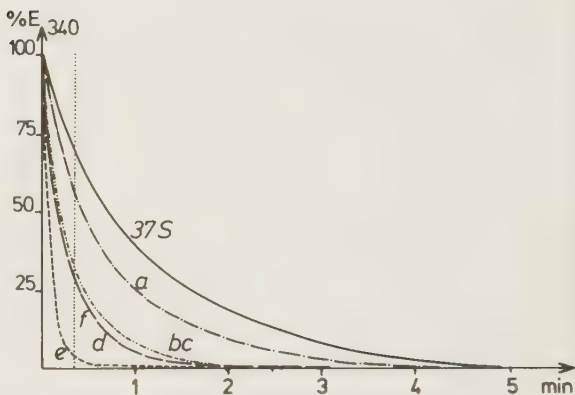


Abb. 42: Bestimmung der 340 nm-Absorption nach Einstellung der Hc-Lösungen auf 50 mM CN⁻; die kontinuierliche Messung beginnt 20 sec nach der Cyanid-Zugabe (senkrecht gepunktete Linie). Die Verbindung der einzelnen Meßkurven zwischen der gemessenen Ausgangsabsorption (100 %) und dem Beginn der kontinuierlichen Messung nach der Cyanid-Zugabe ist experimentell nicht abgesichert. Die Proteinkonzentration der Lösungen lag bei 1.3 - 1.5 mg ml⁻¹.

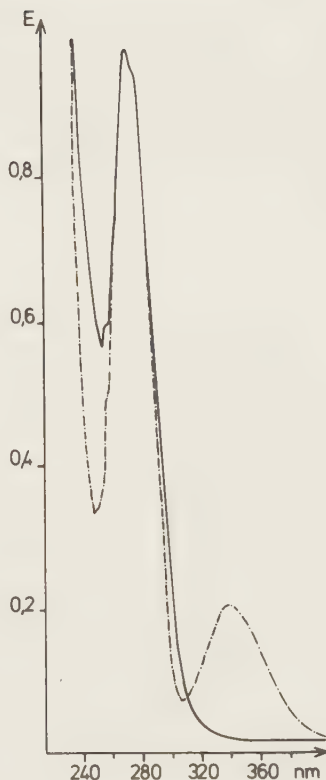


Die immunchemische Charakterisierung des apo-Hämocyanins führte Herr B. Kempter im Rahmen seiner Dissertation durch. Dabei zeigte es sich, daß der Entzug von Kupfer bei allen Untereinheiten den Verlust mindestens einer Determinante bedingt. Dieser in der Tandem-Immunelektrophorese der apo-Hämocyanin-Untereinheiten mit ihren nativen Gegenstücken sichtbare Unterschied war bei den einzelnen Untereinheiten verschieden stark ausgeprägt. Der Entzug des Kupfers führt damit zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins, die sich durch immunologische Techniken nachweisen läßt (KEMPTER, 1983).

3.4. Das UV-Spektrum des apo-Hämocyanins

Das UV-Spektrum von 240 - 400 nm des apo-37 S-Hämocyanins zeigt im proteinspezifischen Bereich von 240 - 310 nm eine auffällige Änderung gegenüber dem Spektrum der oxygenierten Kontrollprobe (Abb. 43): Die Absorption bei dem für Proteinspektren charakteristischen Minimum um 250 nm ist für die apo-Hc-Probe wesentlich größer als für die Kontrollprobe. Auch ist eine leichte Verschiebung des Minimums in den längerwelligen Bereich beobachtbar. Zusätzlich ist eine geringfügige Verbreiterung des 280 nm-Maximums im Bereich von 290 - 310 nm festzustellen, während die Absorption im Bereich von 270 - 285 nm praktisch identisch ist. Diese durch die Entkupferung des Hämocyanins hervorgerufene Veränderung des Spektrums um 250 nm ist besonders interessant, da in diesem Bereich eine Änderung des UV-Spektrums nur auf eine

Abb. 43: UV-Spektrum der 37 S-Hc-Lösung von Abb. 42 vor (---) und 10 min nach (—) Einstellung der Lösung auf 50 mM CN^- .



Änderung des Konzentrationsverhältnisses Tyr/Tyr⁻ im Protein zurückzuführen ist.

Für die Absorptionen von Proteinen im Bereich von 240 - 310 nm sind Cystin, Phenylalanin und vor allem Tryptophan und Tyrosin bzw. Tyrosin⁻ verantwortlich. Für die Untereinheit a (unter der Annahme von 1 Cystin, 32 Phe, 2 Trp und 23 Tyr pro Molekül) wurde unter der Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten des Cystins, Phenylalanins, Tyrosins und Tryptophans das UV-Spektrum in 5 nm-Schritten für den Bereich von 240 - 310 nm berechnet.

Wie Abb. 44 zeigt, führt eine Änderung des angenommenen Konzentrationsverhältnisses von 100 % Tyr + 0 % Tyr⁻ zu 95 % Tyr + 5 % Tyr⁻ (1) zu einer starken Zunahme der Absorption bei 250 nm, (2) zu einer Verschiebung des Minimums von 245 zu 255 nm und (3) zu einer geringfügigen Verbreiterung des 280 nm-Peaks im Bereich von 290 - 310 nm, während die Absorption zwischen 270 - 285 nm gleich bleibt. Bei der für die Untereinheit a gemachten Annahme von 23 Tyrosinresten pro Molekül entsprechen 5 % gerade einem Tyrosinrest (siehe auch S. 97).

Werden die UV-Spektren der Untereinheit a bei pH 8,8 und pH 12,0 bei identischer Proteinkonzentration miteinander verglichen (Abb. 45), so wird der Einfluß des Konzentrationsver-

Abb. 44: Berechnete UV-Spektren für die Untereinheit a. (.....) alle 23 Tyrosinreste pro Molekül a liegen protoniert vor; (---) 5 % der Tyrosinreste sind deprotoniert. (—) gemessenes UV-Spektrum der Untereinheit a bei pH 8.84.

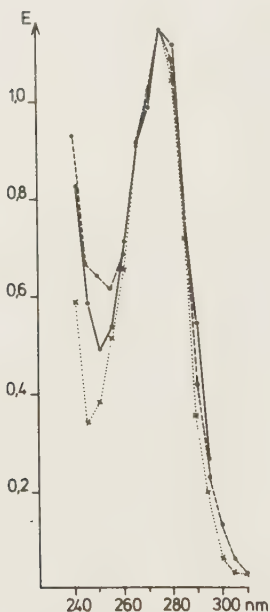
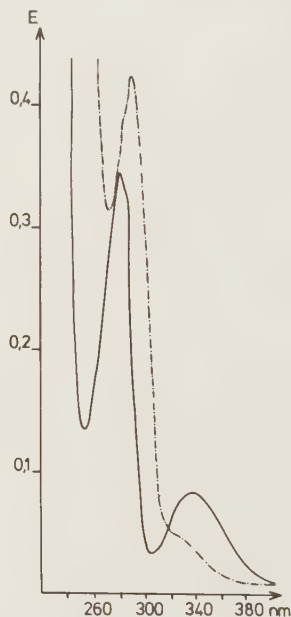


Abb. 45: pH-Abhängigkeit des UV-Spektrums der Untereinheit a. (—) Untereinheit a in Gly/OH-Puffer, pH 8.84; (---) Untereinheit a in Gly/OH-Puffer, pH 11.98; die Proteinkonzentration beider Lösungen war identisch (0.33 mg ml^{-1}).



hältnisses Tyr/Tyr^- auf das UV-Spektrum besonders deutlich: bei pH 8.8 liegen praktisch alle Tyrosinreste ungeladen vor, während bei pH 12.0 fast alle Tyrosinreste deprotoniert sind (pK-Wert des Tyrosins: 10).

Die 280 nm-Absorption ist gegenüber pH-Änderungen äußerst unempfindlich, im Gegensatz zu den Absorptionen bei 275 oder 285 nm. Dieser Befund ist für die routinemäßige Proteinkonzentrationsbestimmung von großer Bedeutung, da keine pH-abhängigen Korrekturfaktoren berücksichtigt werden müssen.

4 Zur Struktur des aktiven Zentrums von Eurypelma-Hämocyanin

Die großen Fortschritte, die in den letzten Jahren bei der Aufklärung der Primärstrukturen von Arthropoden-Hämocyanin gemacht wurden (SCHNEIDER et al., 1983; SCHARTAU et al., 1983; NEMOTO und TAKAGI, 1983; YOKOTA et al., 1983) führten zu der Fragestellung, ob ein bestimmter Sequenzabschnitt als Kupfer-Bindungsstelle zu identifizieren ist. Bei der Sequenzanalyse der Untereinheit e wurde mit

- His - His - Trp - His - Trp - His -

eine außergewöhnliche Aminosäuresequenz ("His/Trp-reiches Peptid") gefunden, die als Kupferbindungsstelle diskutiert wird (SCHNEIDER et al., 1982; YOKOTA et al., 1983). Diese Sequenz konnte bei weiteren vier Untereinheiten aus drei Arthropoden-Hämocyaninen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Versuchsreihen die Frage klären, ob das "His/Trp-reiche Peptid" direkt am Aufbau des aktiven Zentrums als Ligand des Kupfers beteiligt ist:

(1) Durch limitierte Proteolyse einer der Untereinheiten mit Trypsin und Trennung der Spaltprodukte unter möglichst schonenden Bedingungen wurde versucht, kupferhaltige Peptide zu isolieren. Die Aminosäureanalyse dieser Peptide wäre ein schneller Nachweis, ob eines der isolierten Peptide den Sequenzabschnitt 'His-His-Trp-His-Trp-His- enthielt.

(2) Durch Photooxidation der Kupfer-komplexierenden Histidinreste und anschließende Isolierung und Sequenzierung des "His/Trp-reichen Peptids" sollte untersucht werden, ob eines dieser Histidinreste an der Kupferbindung direkt beteiligt ist. Diese Versuche wurden an der Untereinheit a durchgeführt, da diese sich bei limitierter Proteolyse ähnlich verhält wie Untereinheit e und zudem in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

4.1 Isolierung kupferhaltiger Peptide

Die Untereinheit a wurde nach Isolierung über Ionenaustauschchromatographie (siehe S. 19) mit Trypsin nativ gespalten.

Zur Auftrennung des Spaltgemisches in verschiedene Molekulargewichtsbereiche wurde das Spaltprodukt in 4 M Harnstoff, 5 mM β -Mercaptoäthanol, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1 aufgenommen. Dieser Puffer führte bei nativen Untereinheiten nur zu einem geringfügigen Kupferverlust von 10 % (s.o.). Die Gelfiltration über Ultrogel AcA 54 in demselben Puffer führte zu einer Auftrennung in 6 Fraktionen (Abb. 46, I-VI). Die Bestimmung der Kupferkonzentration der einzelnen Fraktionen zeigte deutlich einen scharfen Kupferpeak in Gipfel IV. Interessanterweise war die Kupferkonzentration von Fraktion 12 am größten, während die Peptidkonzentration von Fraktion 13 deutlich größer als die von Fraktion 12 war.

Die kupferhaltigen Fraktionen 12/13 wurden vereinigt. Zur Isolierung der in diesen Fraktionen enthaltenen Peptide wurde das Peptidgemisch carboxymethyliert, entsalzt, lyophilisiert, in 70 %iger (v/v) Ameisensäure gelöst und über die reversed-phase HPLC aufgetrennt (Abb. 47). Dabei wurden 10 Peptide isoliert. Von den Peptiden 1 - 10 wurde die Ameisensäurezusammensetzung bestimmt, keines der Peptide konnte dabei als das "His/Trp-reiche Peptid" identifiziert werden. Mit der Untereinheit f wurde ein analoger Versuch durchgeführt. Auch bei dieser Untereinheit wurde unter den isolierten Peptiden das "His/Trp-reiche Peptid" nicht nachgewiesen.

4.2 Die Photooxidation des Hämocyanins zur spezifischen Modifikation der kupferbindenden Histidine

Die Photooxidation zur selektiven Modifikation von Histidinen wird seit langem in der Proteinforschung eingesetzt, um die Beteiligung dieser Aminosäure am Aufbau der aktiven Zentren nachzuweisen (bei der Superoxid-Dismutase von FORMAN et al., 1973; bei der Tyrosinase von LERCH, 1978).

Abb. 46: Gelfiltration der Untereinheit a nach limitierter Trypsinolyse. Ultrogel AcA 54 in 4 M Harnstoff, 5 mM β -Mercaptoäthanol, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1; Elutionsprofil bei 280 nm, Kupferkonzentration in $\mu\text{A}/10 \mu\text{l}$.

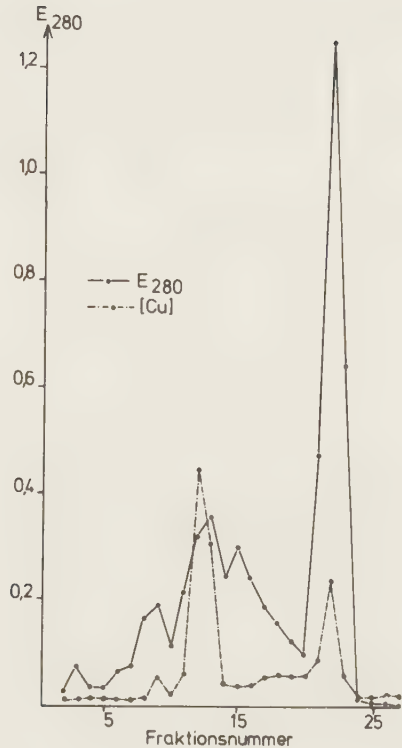
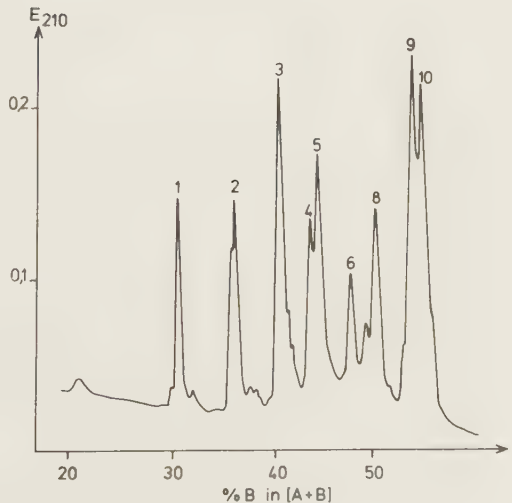
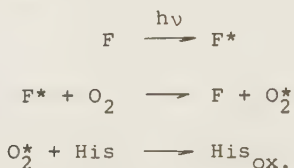


Abb. 47: Reversed-phase HPLC (LiChrosorb RP 18, 250 x 4 mm) des Peptidgemisches von den Fraktionen 12/13 der Gelfiltration (Abb. 46). Lösung A: Ammoniumacetatpuffer, pH 6.0; Lösung B: 70 % Acetonitril in A; linearer Gradient von 0 - 70 % B in (A+B) über 40 min; Durchflußgeschwindigkeit 2 ml min^{-1} ; Gipfel per Hand fraktioniert.



Im Allgemeinen wird bei der Photooxidation von Proteinen ein organischer Farbstoff (wie Methylenblau) als Photosensibilisator (F) zur Probenlösung gegeben, der die Energie des einstrahlten Lichts auf dem in dem Puffer gelösten Sauerstoff überträgt. Dadurch wird der Sauerstoff aus dem Triplett-Grundzustand in den reaktiven Singulett-Zustand angehoben, der den Imidazol-Ring des Histidins oxidativ abbaut (FOOTE, 1968; TOMITA et al., 1969):



Bei dem Zusatz eines im Puffer gelösten Photosensibilisators wird eine gleichmäßige Konzentration von Singulett-Sauerstoff über das gesamte Reaktionsvolumen erzeugt, alle mit dem Lösungsmittel in Kontakt stehende Histidin-Reste können dadurch oxidativ abgebaut werden. Solche Photooxidationen an Hämocyaninen (WOOD und BANNISTER, 1967, 1968; ENGELBORGHs et al., 1968) führten zu einer signifikanten Abnahme der Histidin-Konzentration, der Sauerstoffbindung und der Absorption bei 340 nm. Diese Ergebnisse wurden als weiterer chemischer Nachweis für die Beteiligung von Histidin-Resten an der Kupferkomplexierung angesehen. Zweifellos wurden aber nicht nur die wenigen, am aktiven Zentrum beteiligten Histidin-Reste oxidiert, sondern alle für das Singulett-Sauerstoff erreichbaren. Eine Methode, nur die Histidin-Reste eines kleinen Molekülbereichs des Proteins photooxidativ abzubauen, bestand darin, daß der Photosensibilisator am Protein fixiert wurde. Dadurch kam es zu einer ungleichen Konzentrationsverteilung des Singulett-Sauerstoffs in der Lösung: JORI et al. (1970, 1974) zeigten, daß nur wenige Histidin-Reste des Proteins oxidiert wurden. TALLANDINI et al. (1975) benutzten das oxygenierte aktive Zentrum des Hämocyanins als "eingebauten" Photosensibilisator. Damit sollte eine gezielte Photooxidation nur der in direkter Umgebung der Sauerstoffbindungsstelle befindlichen Histidin-Reste möglich sein. Tatsächlich konnten die Autoren eine geringfügige Abnahme der Histidin-Konzentration neben einer drastischen Abnahme der Sauerstoffbindungsfähigkeit

nachweisen. DE LEY und LONTIE (1977) bestätigten diese Ergebnisse bei der Photooxidation (ohne Zusatz eines Photosensibilisators) von *Helix pomatia*-Hämocyanin, allerdings zeigten umfangreiche Analysen des photooxidierten Proteins, daß die oben skizzierte Interpretation nicht haltbar ist.

Versuche am Hämocyanin aus *Eurypelma californicum*

Das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* wurde ohne Zusatz eines organischen Farbstoffs photooxidiert. Dabei wurde (1) die Abnahme der Histidin-Konzentration, (2) die Veränderung der Absorption bei 340 nm und (3) die Abnahme der Kupferkonzentration untersucht. Ferner wurde versucht, das "His/Trp-reiche Peptid" der Untereinheit a nach Photooxidation zu isolieren und zu sequenzieren. Die Sequenzanalyse dieses Peptids sollte Aufschluß darüber geben, ob und welche Histidin-Reste photooxidiert worden waren. Versuche zum Dissoziations-, Reassoziations- und zum elektrophoretischen Verhalten des photooxidierten Proteins rundeten diese Untersuchung ab.

(1) Die Aminosäureanalyse photooxidierter Hämocyanin-Proben zeigte nur für das Histidin eine signifikante Abnahme der Konzentration, Tryptophan wurde allerdings nicht bestimmt. In Abb. 48 ist die Abnahme der Histidin-Menge von 37 S-Hc mit der Zeit dargestellt. Nach 6 Stunden Bestrahlung waren 31 % des Histidins oxidiert; bei einem durchschnittlichen Histidin-Anteil von 27.6 Histidin-Resten pro Untereinheit (MARKL et al., 1979) wurden folglich 8.6 Histidin-Reste zerstört.

(2) Während der Photooxidation nahm die Absorption der Proteinlösung bei 340 nm stark ab. Die Photooxidation führte zu einer irreversiblen Störung der Sauerstoffbindungsfähigkeit (Abb. 49).

(3) Die Bestrahlung des Hämocyanins führte zu einer starken Abnahme der Kupferkonzentration des Proteins (Abb. 50): wurde der gemessene Kupfergehalt der Kontrolle gleich 100 % gesetzt, so betrug der Kupfergehalt der Proteinprobe nach 30 min Photooxidation 66 % (± 2 %), nach 90 min 27 % (± 2.5 %) und nach 180 min nur noch 15 % (± 1.5 %) (Mittelwerte dreier Versuchsreihen).

Abb. 48: Abhängigkeit der Histidin-Menge einer 37 S-Hc-Probe von der Bestrahlungsdauer. Der Kontrollwert zur Zeit 0 wurde gleich 100 % gesetzt.

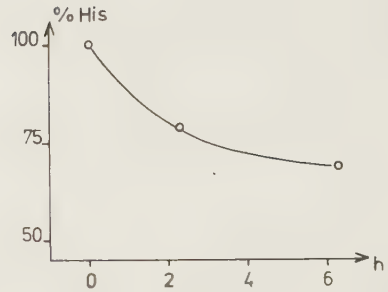


Abb. 49: Das UV-Spektrum einer 37 S-Hc-Lösung in Abhängigkeit zur Bestrahlungszeit.

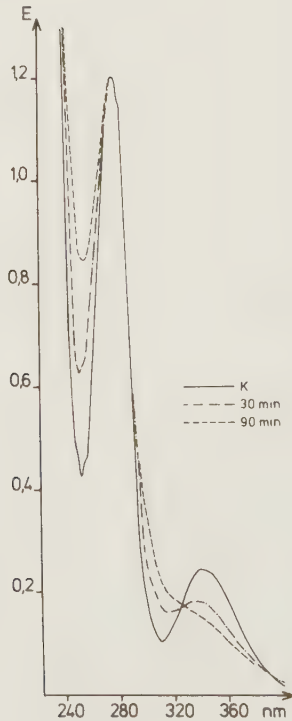


Abb. 50: Kupfergehalt der Hämocyanin-Lösung nach Photooxidation. Die Bestrahlung erfolgte mit einer 200 Watt-Hg-Hochdrucklampe bei einer Proteinkonzentration von 2 m ml^{-1} . Zur Entfernung unspezifisch gebundenen Kupfers wurden die Proben nach Bestrahlung gegen EDTA-haltigen Puffer dialysiert, niedermolekulare Verbindungen wurden vom Hämocyanin durch eine Gelfiltration über Trisacryl GF 05 entfernt. Die Kupferkonzentration der Kontrolle wurde als 100 % gesetzt.

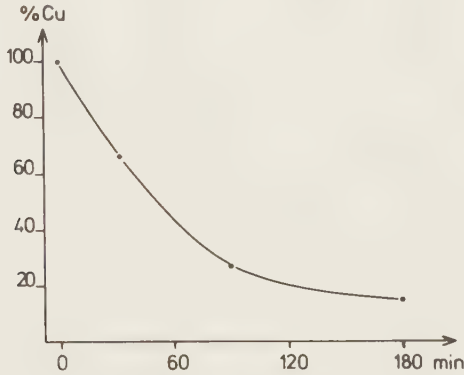
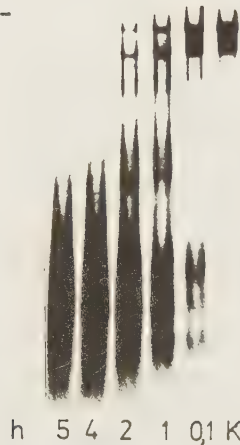


Abb. 51: PAGE von photooxidier-
tem 37 S-Hc; Proben nach
0, 1, 2, 4, und 5 h entnommen.



Wurde 37 S-Hämocyanin bestrahlt, kam es im Laufe der Photooxidation zu einer Dissoziation des 24mers (Abb. 51). Die Produkte der Dissoziation zeigten in der PAGE keine scharfen Banden.

Mit fortschreitender Bestrahlung dissoziiert das Hämocyanin immer stärker. Die Photooxidation führt also zur Zerstörung der Quartärstruktur. Diesem Ergebnis entspricht auch der Ausgang des folgenden Versuchs: wurde 37 S-Dissoziat nach 2- bzw. 6-stündiger Bestrahlung in Tris/HCl-Puffer, pH 8.0, überführt, so zeigte die Analyse in der PAGE, daß die Proben nicht mehr zum 37 S-Hämocyanin reassoziieren können (bei dem nur 2 h bestrahltem Hämocyanin-Dissoziat bleibt diese Fähigkeit noch in geringem Umfange erhalten). Im Gegensatz dazu reassozierte unbestrahltes 37 S-Dissoziat vollständig zum 24mer (K in Abb. 51). Die Hämocyanin-Proben vor der Bestrahlung lieferten in der PAGE ohne SDS die für die einzelnen Untereinheiten charakteristischen scharfen Banden (Abb. 52, K), während bei der bestrahlten Protein-Probe das Gel diffus über weite Bereiche gefärbt wurde. Selbst in Gegenwart von SDS wurden die Banden mit fortschreitender Bestrahlung schwächer und diffuser. Die starke Abnahme der Anfärbbarkeit bestrahlter Proteinproben in der SDS-PAGE konnte nicht erklärt werden. Da in einem der SDS-Gele im niedermolekularen Bereich eine stärkere, diffuse Färbung bei den bestrahlten Proben auftrat, wurde durch Endgruppenbestimmung kontrolliert, ob bei der Photooxidation Peptidbindungen gespalten worden waren. Das Ergebnis war eindeutig negativ.

Die photooxidierten Proteinproben wurden in der zweidimensionalen Immunelektrophorese analysiert. Da die Proben (37 S-Dissoziat) über eine Trisacryl-GF05-Säule in Tris/HCl, pH 8.0, von niedermolekularen Substanzen getrennt wurden, kam es zu einer Reassoziation der Untereinheiten. In der immunchemischen Analyse zeigte nur die unbestrahlte Kontrollprobe eine fast vollständige Reassoziation, während die gleichbehandelten, photooxidierten Proben nicht reassozierten. Je länger die Probe bestrahlt worden war, desto geringer war in der Immunelektrophorese der Anteil scharf begrenzter, definierter Banden. Dagegen nahm ein diffuser, für denaturiertes Protein typischer Peak (STÜCKER, persönliche Mitteilung) zu (Abb. 53).

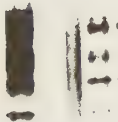
K 2 6

-37 S

Abb. 51: PAGE nach Überführung von 37 S-Dissoziat in Tris/HCl-Puffer pH 8.0; K nicht bestrahltes 37 S-Dissoziat, vollständig zum 37 S-Hämocyanin) reassoziert; 2 und 6: 37 S-Dissoziat, 2 bzw. 6 h photooxidiert, unter gleichen Reassoziationsbedingungen: nur geringe (2 h) oder gar keine (6 h) Reassozi-ation.

Abb. 52: PAGE von 37 S-Dissoziat vor (K) und nach Photooxidation; a) PAGE ohne, b) PAGE mit SDS, 1 = Proteinmaterial nach 30 min, 2 nach 90 min und 3 nach 180 min Bestrahlung.

a)



1 2 3 K

b)



K 1 2 3

Abb. 53: Zweidimensionale Immunelektrophorese von 37 S-Dissoziat nach Photooxidation; das Material wurde bei pH 8.0, d.h. unter Reassoziationsbedingungen, von niedermolekularen Substanzen abgetrennt. a) Kontrolle (nicht bestrahlt), b) nach 30 min, c) nach 90 min und d) nach 180 min Photooxidation. Es wurde immer die gleiche Menge Protein eingesetzt.

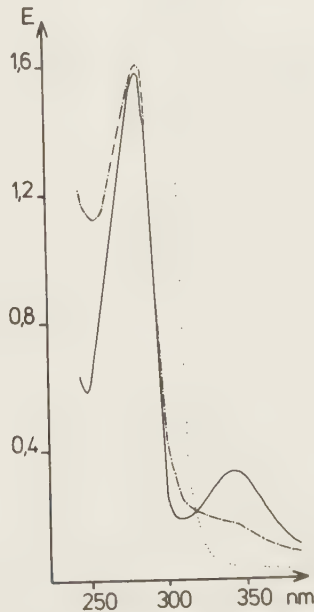


Während die Ergebnisse (1) - (3) die Zerstörung des aktiven Zentrums des Hämocyanins durch die Photooxidation ohne Zusatz eines Photosensibilisators belegen und mit den Ergebnissen von TALLANDINI et al. (1975) im Einklang stehen, weisen die weiteren Analyseergebnisse darauf hin, daß sich die Auswirkung der Photooxidation nicht auf das aktive Zentrum beschränkt. Vielmehr wird die Tertiärstruktur allgemein durch die Bestrahlung stark verändert, das photooxidierte Protein muß als denaturiert bezeichnet werden. Dieses wird auch bestätigt durch das starke Ansteigen der Absorption mit abnehmender Wellenlänge.

4.3 Isolierung und Sequenzierung des "His/Trp-reichen Peptids" nach Photooxidation der Untereinheit a

Das "His/Trp-reiche Peptid" der Untereinheit a kann nach SCHNEIDER et al. (1982) präparativ isoliert werden. Um die Frage zu beantworten, ob bei der Photooxidation ein oder mehrere Histidinreste dieses Peptids modifiziert werden, wurde nach Bestrahlung der Untereinheit a das "His/Trp-reiche Peptid" isoliert und sequenziert. 30 mg der Untereinheit a, gelöst in 0.1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.1, wurden für 6 h photooxidiert. Das UV-Spektrum vor und nach der Photooxidation (Abb. 54) sowie die Kupferkonzentration wurden zur Kontrolle der Photooxidation gemessen. Während das UV-Spektrum der bestrahlten Probe nur noch eine geringe Absorption bei 340 nm zeigte, wurde der Kupfergehalt der bestrahlten Probe mit der Atomabsorptionsspektroskopie zu 32 % (gegenüber der Kontrolle, deren Kupfergehalt zu 100 % gesetzt wurde) bestimmt.

Abb. 54: UV-Spektrum der Untereinheit a vor (—) und nach 6 h Bestrahlung (---) unter Verwendung einer 10 %igen Acetonlösung (Schichtdicke 1 cm) als Filter (.....).



Nach Carboxymethylierung wurde das Protein tryptisch gespalten. Das Spaltgemisch wurde lyophilisiert, in 8 M Harnstoff, HCl, pH 3.5, aufgenommen und über eine Sephacryl S 200 sf-Säule (1.5 x 160 cm) chromatographiert. Dabei traten vier Gipfel auf (Abb. 55). Die Peptidgemische der Gipfel 1 - 4 wurden über eine Trisacryl GF 05 - Gelfiltration (in 5 %iger Essigsäure) vom Harnstoff getrennt, lyophilisiert, in 70 %iger (v/v) Ameisensäure gelöst und über die reversed-phase HPLC aufgetrennt (Abb. 56).

Abb. 55: Gelfiltration nach Trypsinolyse der photooxidierten Untereinheit a über Sephacryl S 200 sf-Säule (1.5 x 160 cm), 8 M Harnstoff, HCl, pH 3.5, Durchflußgeschwindigkeit 3 ml h⁻¹, 30 min-Fractionen.

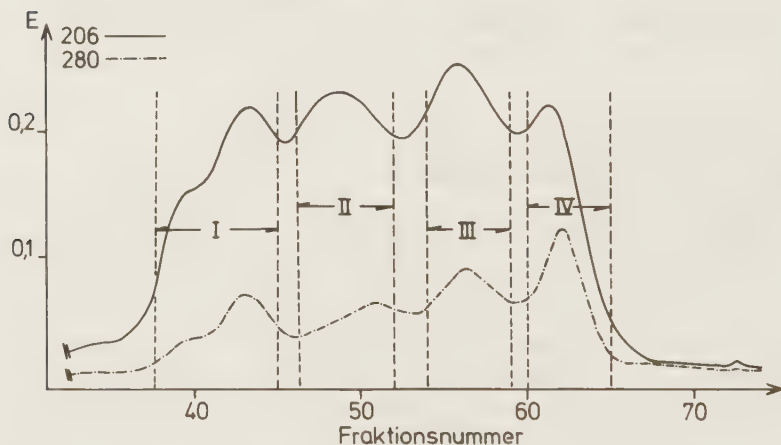
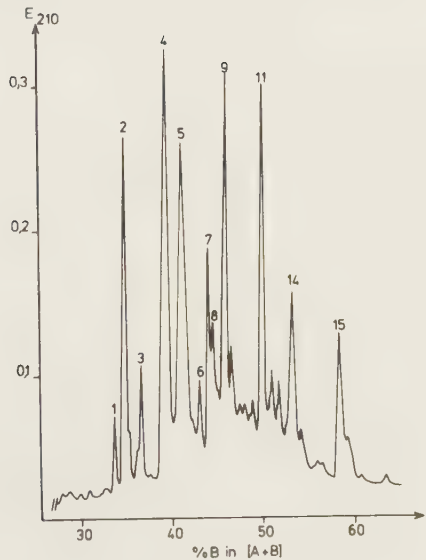
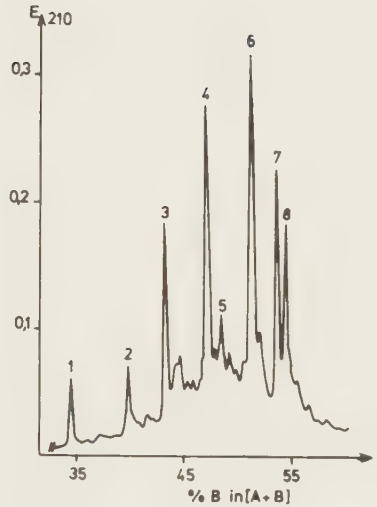
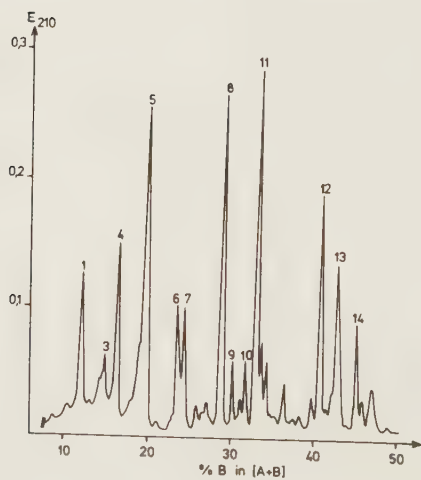
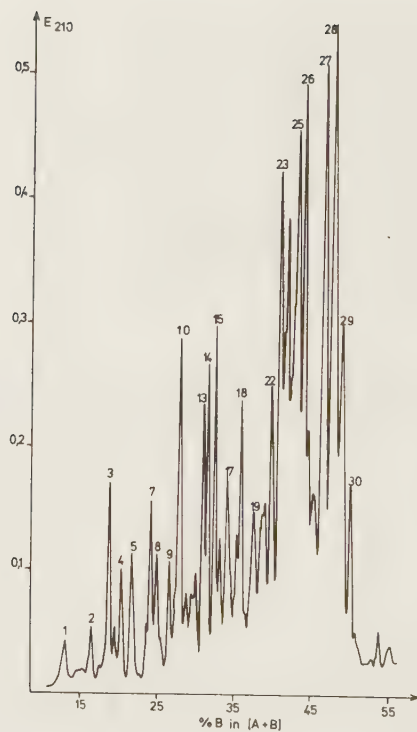


Abb. 56: Reversed-phase HPLC (VYDAC TP RT 10, 250 x 4 mm, Fa. CHROMPACK) der Peptidgemische I (a), II (b), III (c) und IV (d) der Gelfiltration von Abb. 55.

Lösung A: 0.1 % Trifluoressigsäure;
Lösung B: 70 % Acetonitril in A;
linearer Gradient von 0 - 70 % B in (A+B) über 40 min; Durchflußgeschwindigkeit 2 ml min⁻¹; Gipfel per Hand fraktioniert.





Das "His/Trp-reiche Peptid" wurde im Peptidgemisch III oder IV der Gelfiltration (Abb. 55) vermutet. Zur Reindarstellung einzelner Peptide wurden diese unter identischen Bedingungen rechromatographiert. Dabei erwies es sich als äußerst effektiv, gleichzeitig mehrere Peptide in einem Lauf zu rechromatographieren (Abb. 57). Auf Grund der Bestimmung des N-Terminus mit der DABITC-Methode wurde Peptid Nr. 28 der HPLC-Trennung des Peptidgemisches III der Gelfiltration (Abb. 55) als das "His/Trp-reiche Peptid" identifiziert. Die Aminosäureanalyse dieses Peptids zeigte nur eine geringfügige Abnahme des Histidingehaltes: wurde die Histidinmenge der unbehandelten Kontrolle zu 100 % gesetzt, so wurde für das photooxidierte Peptid ein Wert von 92 % ermittelt (Mittelwert zweier Aminosäureanalysen).

Bei der automatischen Flüssigphasensequenzierung dieses Peptids wurde bei der Identifizierung der PTH-Aminosäuren durch isokratische HPLC (LOTTSPREICH, 1980) bei der mit * gekennzeichneten Aminosäure eine deutlich geringere Ausbeute ermittelt:

- His - His* - Trp - His - Trp - His -

(LOTTSPREICH, persönliche Mitteilung): im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle (= 100 %) wurden nur noch 60 % gefunden.

Abb. 57: Rechromatographie der Peptide 10, 15, 18, 23, 26 und 28 von der HPLC-Trennung Abb. 56c; HPLC-Bedingungen wie unter Abb. 56 beschrieben.



5 Aminosäuresequenzen tryptischer Peptide der Untereinheit a;
Vergleich mit Sequenzabschnitten anderer Untereinheiten von
Arthropoden-Hämocyanin

Bei der Aufarbeitung der tryptischen Peptide der Untereinheit a nach Photooxidation wurde von den über die reversed-phase HPLC getrennten Peptide der Molekulargewichtsbereiche III und IV (Abb. 56) die Peptide 10, 14, 15, 18, 22, 23, 25, 26, 27 und 28 (Molekulargewichtsbereich III) sowie die Peptide 11 und 12 (Molekulargewichtsbereich IV, Abb. 56d) sequenziert. Die nach CHANG et al. (1978) durchgeführte Sequenzierung der Peptide mit dem DABITC-Reagenz ließ keine Unterscheidung zwischen Isoleucin und Leucin zu, in einigen Fällen konnte auf Grund einer eindeutigen Aminosäureanalyse eine der beiden Aminosäuren ausgeschlossen werden. Alle Peptide mit starker Absorption bei 210 nm und längeren Retentionszeiten wurden N-terminal charakterisiert, um sicher zu gehen, daß durch die Photooxidation keine weiteren, sich chromatographisch unterscheidenden Oxidationsprodukte des "His/Trp-reichen Peptids" entstanden waren.

Einige der in Tab. 7 aufgeführten Sequenzen der Untereinheit a zeigen sehr starke Homologien mit schon bekannten Sequenzabschnitten anderer Arthropoden-Hämocyanin-Untereinheiten (Tab. 8). Vom Peptid 28 des Molekulargewichtsbereichs III (Abb. 56c), dem "His/Trp-reichen Peptid", war die ausgeprägte Homologie zwischen den Untereinheiten a, d, e von *Eurypelma californicum*, Kette α von *Tachypleus tridentatus*, Untereinheit II und IIb vom *Limulus polyphemus* bereits bekannt (SCHNEIDER et al., 1982; NEMOTO und TAKAGI, 1983; YOKOTA et al., 1983). Die Homologie (ohne Berücksichtigung der Austauschungen zwischen isofunktionellen Aminosäuren) der beiden sequenzierten Untereinheiten d und e von *Eurypelma californicum* Hämocyanin beträgt 56 % (SCHARTAU et al., 1983a und b; SCHNEIDER et al., 1983).

Tab. 7: N-terminale Sequenzen tryptischer Peptide der photo-oxidierten Untereinheit a; Molekulargewichtsbereich III (Abb. 56c) und Molekulargewichtsbereich IV (Abb. 56d);
* dieses Peptid wurde über 20 Schritte zusätzlich auch automatisch von Herrn Dr. F. Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried, sequenziert.

Molekulargewichtsbereich III

Peptid

- 10 T - I/L - P - V - Y - S - G - (G) -
14 H - Y - A - Q - R - P - D - G - L - A -
15 H - Y - A - Q -
18 A - M - G - Y - P - F - D - R -
22 I/L - I/L - P - A - D - S - I/L -
23 F - I - D - N - I - F - Q - E - Y -
25 K - G - E - I/L - F - Y - Y - M - H - Q - Q - M -
26 I/L - Y - I/L - Q - (V) - D - S - F - Y - H - H - I/L -
27 G - Y - Y - G - S - L - H - N - (W) - G - H -
28* E - D - I - G - V - N - A - H - H - W - H - W - H -

Molekulargewichtsbereich IV

Peptid

- 11 I/L - A - Y - I/L -
12 G - Y - Y - G - S -

Tab. 8: Homologien zwischen der Untereinheit a und
 1) der Untereinheit e (SCHNEIDER et al., 1983) und
 2) der Untereinheit d (SCHARTAU et al., 1983b) des
 Hämocyanins von Eurypelma californicum sowie
 3) der Kette α von Tachypleus tridentatus (NEMOTO
 und TAKAGI, 1983) und 4) Limulus polyphemus Hämocyanin II
 (YOKOTA et al., 1983) bzw. 5) IIIb (SCHNEIDER et al.,
 1982).

Peptid

14		H	Y	A	Q	R	P	D	G	L	A			
1)		P	Y	A	F	R	P	D	G	L	C			
2)		S	Y	G	S	R	P	A	G	M	H			
3)		H	Y	G	V	R	P	S	G	M				
18		A	M	G	Y	P	F	D	R					
1)		P	M	G	F	P	F	D	R					
2)		A	M	G	Y	P	F	D	R					
3)		P	M	G	F	P	F							
25		K	G	E	I/L	F	Y	Y	M	H	Q	Q	M	
1)		K	G	E	L	F	Y	Y	M	H	Q	Q	M	
2)		K	G	E	L	F	Y	Y	M	H	Q	Q	M	
3)		K	G	E	L	F	F	Y	M	H	Q	Q	M	
4)		K	G	E	L	F	Y	Y	M	H				
26		I/L	Y	I/L	Q	(V)	D	S	F	Y	H	H	I/L	
1)		L	N	I	E	L	D	K	F	K	A	T		
2)		L	Y	I	Q	L	D	K	F	H	R	R		
27		G	Y	Y	G	S	L	H	N	(W)	G	H		
1)		L	Y	Y	G	P	L	H	H	W	G	H		
2)		P	Y	Y	G	T	L	H	N	W	G	H		
3)		Q	Y	Y	G	S	L	H	N	W	G	H		
28		E	D	I	G	V	N	A	H	H	W	H	W	H
1)		E	D	V	G	T	N	A	H	H	W	H	W	H
2)		Q	D	L	G	V	N	A	H	H	W	H	W	H
3)		E	D	L	G	V	N	A	H	H	W	H	W	H
4)								A	H	H	W	H	W	H
5)		E	D	I	G	T	N	A	H	H	W	H	W	H

D DISKUSSION

1 Die Isolierung der Untereinheiten f, b und c

Ausgangsmaterial für die Isolierung der Untereinheit f ist das Dimerengemisch, das nach alkalischer Dissoziation des 37 S-Hämocyanins durch Gelfiltration vom Monomerengemisch getrennt wird. Die Trennung der Untereinheit f von den nur als Dimer vorliegenden Untereinheiten b und c erfolgt sowohl gelchromatographisch (SCHNEIDER et al., 1977) als auch über Ionenaustauschchromatographie praktisch quantitativ. Damit beschränkt sich das Problem der präparativen Reindarstellung der Untereinheit f auf die Trennung von den monomeren Untereinheiten, die zu ca. 10 % das "Dimerengemisch" verunreinigen. Das Dimerengemisch setzt sich aus 20 % (± 10 %) f_2 , 70 % (± 10 %) bc und 10 % (± 5 %) der übrigen Monomere zusammen. Letztere liegen in einem ungefähren Mengenverhältnis von a:d:e:g = 1:3:3:3 vor.

Diese Verunreinigungen der Dimeren mit monomeren Untereinheiten sind nicht nur auf eine Überlappung des Dimeren- und des Monomerenpeaks der gelchromatographischen Trennung zurückzuführen. Als Ursache der Verunreinigung ist vor allem Reassoziaton der Untereinheiten im 37 S-Dissoziat während der Gelfiltration anzusehen. Nur so wird verständlich, daß Untereinheit e, die als erste der monomeren Untereinheiten nach den Dimeren eluiert wird, und Untereinheit d, die als letzte der Monomeren im absteigenden Ast des Monomerengipfels eluiert wird, in etwa gleicher Konzentration im Dimerengemisch nachzuweisen sind. Die Bildung von Reassoziaten im 37 S-Dissoziat während der Gelfiltration wird durch die hohe Proteinkonzentration ($\geq 50 \text{ mg ml}^{-1}$), die zu Beginn der Gelfiltration eingestellt wird, gefördert. Wird Untereinheit f nach Spaltung des Homodimers f_2 gelchromatographisch vom Heterodimer bc getrennt, so werden die das Dimerengemisch verunreinigenden Monomere alle zusammen mit der Untereinheit f eluiert; die nach dieser Methode isolierte Untereinheit f ist zu ca. 35 % mit den Untereinheiten a, d, g und e verunreinigt (Abb. 6). Die Verunreinigungen der Untereinheit f lassen sich auf unter 10 % reduzieren, wenn Untereinheit f über Anionenaus-

tauschchromatographie nachgereinigt bzw. direkt durch Anionenaustausch des Dimerengemisches isoliert wird. Dabei wird Untereinheit f in einigen der Fraktionen absolut frei von Verunreinigungen isoliert (Abb. 12). Die Ionenaustauschchromatographie des Dimerengemisches zeigt zwei unerwartete Ergebnisse: obwohl im Ausgangsmaterial Untereinheit f nur als Homodimer f_2 vorliegt, und die Ionenaustauschchromatographie ohne Zusatz reduzierender Agentien durchgeführt wird, läßt sich Untereinheit f im Eluat sowohl in monomerer (1. Gipfel) als auch in dimerer (2. Gipfel) Form nachweisen. Von Aufarbeitung zu Aufarbeitung schwankte das Verhältnis dimerer zu monomerer f stark (die Grenzwerte für das Mengenverhältnis $f_2:f$ lagen bei 2:1 bis 6:1). Es fiel auf, daß der Anteil an monomerer f zunahm, je länger das Dimerengemisch im Dissoziationspuffer vorlag. Der teilweise Zerfall des Homodimers f_2 wird auf S. 91 ausführlich diskutiert.

Von Interesse ist auch, daß ein Teil der Untereinheit b als Homodimer b_2 isoliert wird (3. Gipfel). Dieses Ergebnis wurde als Isolierungsartefakt interpretiert (MARKL, persönliche Mitteilung): das am Austauscher gebundene Heterodimer bc wird während der Ionenaustauschchromatographie partiell gespalten. Möglicherweise wird Untereinheit c wesentlich fester am Austauscher gebunden. Daher kann b zum Homodimer b_2 reassoziieren. Diese Hypothese - das Homodimer b_2 als Isolierungsartefakt - steht im Widerspruch zu folgenden experimentellen Ergebnissen:

- a) die von den Untereinheiten b und c gebildeten Dimere sind sehr stabil, nach alkalischer Dissoziation lassen sie sich ausschließlich im Dimerengemisch nachweisen; erst der Zusatz hoher Harnstoffkonzentrationen (≥ 4 M) führt zu einer Dissoziation.
- b) Die bei der Ionenaustauschchromatographie auftretende starke Konzentrierung der Proteinlösung wirkt einer Dissoziation entgegen.
- c) Die Schärfe und Symmetrie des b_2 -Gipfels im Elutionsprofil ist mit einem Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht während der Chromatographie nicht vereinbar. Die Analyse der einzelnen Fraktionen des Dimerengipfels bei der Monomeren-Dimeren-Trennung in der SDS-PAGE zeigt kein konstantes Mengenverhältnis $b:c = 1:1$, wie es zu fordern ist, wenn die Untereinheit b und c

ausschließlich als Heterodimer bc vorliegen. Diese Ergebnisse, und die Analyse der b- und c-haltigen Fraktionen des Ionenaustausches zur Trennung der Dimeren sprechen für eine - wenigstens partielle - Austauschbarkeit der Untereinheit b und c im 37 S-Molekül: das Heterodimer bc ist mit dem Homodimer b_2 und möglicherweise auch mit dem Homodimer c_2 isofunktionell. Die von MARKL et al. (1981) aufgeklärte Quartärstruktur des 24mers sollte vielleicht dahingehend modifiziert werden, daß die im 24mer zentral gelegenen Dimere nicht streng definiert als Heterodimer bc vorliegen müssen, sondern, daß auch Homodimere dieser Untereinheiten die Bildung funktioneller 37 S-Moleküle zulassen. Möglicherweise kann zwar Untereinheit c durch b, nicht aber b durch c ersetzt werden. Letzteres würde erklären, warum bisher noch kein c_2 -Homodimer isoliert wurde.

Zum $f_2 \rightleftharpoons 2f$ -Gleichgewicht

Dimere sind für den Aufbau der Quartärstruktur vieler Arthropoden-hämocyanine von entscheidender Bedeutung (MURRAY and JEFFREY, 1974; LAMY et al., 1977; BIJLHOLT et al., 1979; MARKL et al. 1981). Auch für die Quartärstruktur des 37 S-Moleküls von *Eurytelma californicum* sind Dimere wesentlich. So scheint die Dimerisierung der Untereinheit f für die Verknüpfung zweier Dodekamere zum nativen 24mer wichtig zu sein: unter den reduzierenden Bedingungen, die zu einer quantitativen Dissoziation des Homodimers f_2 führen, läßt sich auch das 24mere native Hämocyanin in zwei Dodekamere spalten (SAVEL, persönliche Mitteilung). Frühere Experimente zum Verhalten der Untereinheit f haben gezeigt, daß das Dimer f_2 a) quantitativ durch Zusatz reduzierender Agentien (wie 5 mM Cystein); b) durch Einwirkung denaturierender Agentien (wie SDS) bzw. c) partiell durch die Bedingungen der alkalischen Dissoziation ($pH \geq 9.6$) in die Monomere zerfällt.

Diese Ergebnisse wurden bisher so interpretiert, daß durch intramolekulare Disulfidbrücken eine Tertiärstruktur der Untereinheit f stabilisiert wird, die eine Dimerisierung zweier Moleküle f über nichtkovalente Wechselwirkungen ermöglicht. Die Spaltung der Di-

sulfidbrücken soll zu einer Änderung der Tertiärstruktur führen, die eine Dimerisierung der f verhindert (SCHNEIDER et al., 1977, SCHNEIDER, 1978; MARKL et al., 1981).

Im Gegensatz dazu führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu der Vorstellung, daß die Dimerisierung der Untereinheit f über intermolekulare Disulfidbrücken erfolgt: im 24mer des nativen Hämocyanins werden demnach zwei Dodekamere über intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den sich gegenüberliegenden Untereinheiten f kovalent miteinander verknüpft. Dieses steht im Einklang mit elektronenmikroskopischen Befunden: die Bildung eines f_2 -Dimers über nichtkovalente Bindungen setzt eine große Zahl derartiger Bindungen (einen flächenhaften Kontakt) zwischen den beiden Untereinheiten voraus. Dieser Flächenkontakt zwischen zwei sich im 37 S-Molekül gegenüberliegenden f-Untereinheiten ist auf elektronenmikroskopischen Bildern (MARKL et al., 1981) nicht zu erkennen. Die Aufnahmen lassen höchstens einen äußerst begrenzten, direkten Kontakt zwischen zwei f-Molekülen (wie einer Disulfidbrücke) zu. Bei der alkalischen Dissoziation zerfällt das 37 S-Molekül in Dimere und Monomere, wobei Untereinheit f sowohl im Dimerengemisch (als Homodimer f_2) als auch im Monomerengemisch isoliert wird. Der Zerfall der Quartärstruktur führt zu einer Destabilisierung des Homodimers f_2 , das dabei teilweise in die Monomere zerfällt. Diese langsame Dissoziation ist auch während der Monomeren-Dimeren-Trennung beobachtbar: das von SCHNEIDER (1978) beschriebene Auftreten der Untereinheit f im Eluat der Gelfiltration zwischen dem Dimeren- und dem Monomerengipfel ist auf eine fortwährende Dissoziation des Dimers f_2 in die Monomere zurückzuführen. Dieser Vorgang geht auch während der Ionenaustauschchromatographie der Dimeren weiter.

Die Dissoziation des f_2 -Dimers in die Monomere ist nur teilweise reversibel (SCHNEIDER, 1978): wird das Homodimer mit reduzierenden Agentien in die Monomere gespalten und das Reduktionsmittel anschließend entfernt, so dimerisiert nur ein Teil der monomeren f zum Dimer f_2 .

Alle diese Befunde lassen sich durch Dimerisierung der Untereinheit f über eine intermolekulare Disulfidbrücke erklären, wenn folgende Zusatzannahme gemacht wird: in der Nähe der Disulfidbrücke ist eine freie SH-Gruppe vorhanden. Im 37 S-Molekül sind die beiden über eine Disulfidbrücke verbundenen f-Untereinheiten in ihrer Lage zueinander streng fixiert, eine freie Rotation der beiden Untereinheiten um die Disulfidbrücke ist durch die Einbindung der Untereinheiten in die Quartärstruktur nicht möglich. Wird die Quartärstruktur des 37 S-Moleküls zerstört, so wird die räumliche Fixierung der beiden Untereinheiten zueinander aufgehoben, eine Reaktion der Disulfidbrücke mit der postulierten, freien SH-Gruppe wird nicht mehr behindert. Es kommt unter Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken zur Dissoziation des Dimers. Die intramolekularen Disulfidbrücken dieser f-Monomere verhindern eine Reassoziation zu Dimeren. Die Bildung von Monomeren mit intramolekularen Disulfidbrücken als Isolierungsartefakt könnte auch das oben angeführte Ergebnis erklären, daß nach quantitativer Dissoziation des Dimers f_2 durch ein reduzierendes Agens bei Entfernung des Reduktionsmittels keine vollständige Reassoziation der Monomere zu Dimeren erreichbar ist: bei Entfernung des reduzierenden Agens kommt es zu einer Konkurrenzreaktion zwischen der Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken.

Diese Vorstellung der f-f-Dimerisierung über intermolekulare Disulfidbrücken fordert also zwei Formen, in denen die Untereinheit f vorliegen kann, eine mit freien SH-Gruppen und eine mit einer intramolekularen Disulfidbrücke. Letztere (ein Isolierungsartefakt) sollte durch Verwendung von reduzierenden Agentien quantitativ in die ersteren überführt werden können. Dieses wurde bei der Analyse eines Monomeren-Dimeren-Gemisches der Untereinheit f in der PAGE beobachtet: das Gel zeigt drei Banden: eine Dimeren- und zwei Monomeren-Banden. Bei Zusatz von β -Mercaptoäthanol dagegen ist nur eine einzige Bande in der PAGE nachweisbar: die Dimerenbande und die untere Monomerenbande sind verschwunden, die obere Monomerenbande hat an Intensität stark zugenommen (Abb. 39). Das ist aber zu fordern, wenn β -Mercapto-

äthanol die intermolekulare Disulfidbrücke des Dimers f_2 als auch die intramolekulare Disulfidbrücke monomerer f-Untereinheiten reduziert.

Eine weitere Stütze für das Argument kann man schließlich darin sehen, daß Untereinheit f des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* immunologisch verwandt ist mit derjenigen Untereinheit des Hämocyanins der Spinne *Cupiennius salei*, die über eine intermolekulare Disulfidbrücke (unter Bildung des Homodimers) zwei Hexamere zum Dodekamer verbindet (MARKL et al., 1981).

2 Chemische und enzymatische Spaltungen der Untereinheit f

Die Spaltung der Kette f mit Bromcyan verläuft nicht quantitativ; bei 15 Methioninresten pro Molekül werden 3 Methioninreste vom Bromcyan nicht angegriffen. Auch eine drastische Verlängerung der Inkubationszeit läßt keine bessere Spaltausbeute erwarten, wie die Versuche zur Kinetik der BrCN-Spaltung der Kette f zeigten (Abb. 21). Dagegen nimmt dann die Menge der unerwünschten Spaltprodukte als Folge von Nebenreaktionen (unspezifische Säurespaltung) deutlich zu. Während für die meisten Met-X-Bindungen (X = eine der zwanzig proteinogenen Aminosäuren) eine quantitative Spaltung durch Bromcyan angenommen wird, sind niedrige Spaltausbeuten für die Sequenzen Met-Ser (NARATI und TITANI, 1968), Met-Thr (SCHROEDER et al., 1969) und Met-Ile (KOLB et al., 1974) beschrieben worden. Die BrCN-Spaltung der Kette e zeigte für die einzelnen Methioninreste ebenfalls stark unterschiedliche Spaltausbeuten (SCHNEIDER, persönliche Mitteilung). Zusätzlich können Nebenbanden als Folge einer Spaltung bei Tryptophan auftreten, wie sie BRAUNITZER und ASCHAUER (1975) bei der Bromcyanspaltung des β -Lactoglobulins AB des Rindes fanden. Auch bei der Bromcyanspaltung der Kette d wurde diese Reaktion beobachtet: zwei der nach Bromcyanspaltung der Kette d isolierten Peptide entstanden durch Spaltung nach Tryptophan (SCHARTAU, persönliche Mitteilung). Das Auftreten mehrerer Peptide mit einem Molekulargewicht um 14 000 nach Spaltung der Kette f mit Bromcyan (Abb. 25) läßt sich damit erklären, daß eine größere, methioninfreie Sequenz eingerahmt wird von Sequenzabschnitten, die kurz nacheinander mehrere Methioninreste enthalten. Bei unterschiedlicher Spaltausbeute an den einzelnen Methioninen kommt es dann zur Bildung vieler chemisch sehr ähnlicher Peptide mit geringen Molekulargewichtsunterschieden.

Nach der Bromcyanspaltung der Kette f werden zwei große methioninfreie Peptide als BrCN-Peptide identifiziert: eines mit einem Molekulargewicht von ca. 22.000 und eines von ca. 14.000. Auch bei der Sequenzanalyse der Kette d (SCHARTAU et al., 1983b) und der Kette e (SCHNEIDER et al., 1983) wurden BrCN-Peptide ähnli-

cher Größe gefunden (bei der Kette d ist der Sequenzabschnitt 91 - 200, entsprechend einem MG von ca. 12.000 und der Sequenzabschnitt 365 - 537, entsprechend einem MG von ca. 19.000, methioninfrei).

Neben der Spaltung der Kette f mit Bromcyan bieten sich die limitierten Proteolysen der Untereinheit f mit Trypsin bzw. Staphylococcus aureus-Protease als einen Einstieg in die Sequenzanalyse der Kette f an: alle diese Spaltungen führen zur Isolierung größerer Spaltprodukte. Diese Spaltprodukte wären dann tryptisch (vor und nach Modifikation ihrer Lysinreste mit ETPA) zu spalten, das Peptidgemisch über die reversed-phase HPLC in die einzelnen Peptide zu trennen und die isolierten Peptide zu sequenzieren (wie es in dieser Arbeit für einen Teil der tryptischen Peptide der photooxidierten Untereinheit a durchgeführt wurde).

3 Tyrosin als endogener Cu(II)-Cu(II)-Brückenligand im aktiven Zentrum des Eurypelma-Hämocyanins

Chemische und spektroskopische Untersuchungen zur Aufklärung des aktiven Zentrums bei Hämocyaninen (SOLOMON, 1982, Review) führten zu einem Modell des oxygenierten Hämocyanins, wie es Abb. 4 zeigt (BROWN et al., 1980). Während die Komplexierung eines Kupferions durch drei Stickstoffatome verschiedener Imidazolringe als gesichert angesehen wird (HIMMELWRIGHT et al., 1980; BROWN et al., 1980), ist der endogene Brückenligand X noch nicht eindeutig identifiziert.

UV-Spektren oxygenierter Hämocyaninlösungen bei tiefen Temperaturen lassen bei 400 nm eine Absorption erkennen, die als Phenolat-Kupfer-Charge-Transfer-Übergänge erklärt werden können, so daß Tyrosin als möglicher Brückenligand favorisiert wird (HIMMELWRIGHT et al., 1979). Diese Hypothese steht auch im Einklang mit der Beobachtung, daß der endogene Brückenligand nur im oxygenierten Hämocyanin die beiden Cu(II)-Ionen verbindet, nicht dagegen die beiden Cu(I)-Ionen im desoxygenierten Hämocyanin: als weiches Kation ist für das Cu(I)-Ion eine Wechselwirkung mit dem Tyrosinanion energetisch weniger günstig (BROWN et al., 1980). Ein weiterer, indirekter Hinweis für die Beteiligung von Tyrosin (als Brückenligand) an der Kupferkomplexierung im oxygenierten Hämocyanin resultiert aus dem Vergleich der UV-Spektren von oxygeniertem Hämocyanin und apo-Hämocyanin (Abb. 42). Die beim apo-Hämocyanin auftretende deutliche Verstärkung der Absorption im Bereich des für Proteine typischen Absorptionsminimums bei 250 nm spricht ebenfalls für Tyrosin als Brückenligand: im oxygenierten Hämocyanin ist das die beiden Cu(II)-Ionen verbindende Tyrosin für die pH-abhängige Gleichgewichtseinstellung $\text{Tyrosin} \rightleftharpoons \text{Tyrosinanion}$ blockiert. Bei kupferfreiem Hämocyanin dagegen wird für das Tyrosin diese Gleichgewichtseinstellung möglich, in alkalischer Lösung erhöht sich dadurch die Konzentration der Tyrosinanionen. Eine kleine Verschiebung im Verhältnis der Tyrosin-Tyrosinanion-Konzentrationen führt aber zu einer deutlichen Veränderung der Absorption bei 250 nm,

da in diesem Wellenlängenbereich die Extinktionskoeffizienten von Tyrosin und Tyrosinanion sich um das 50fache unterscheiden. Da sich die Änderungen der UV-Spektren von oxygeniertem und apo-Hämocyanin ausschließlich auf die Wellenlängenbereiche beschränken, die auf Tyrosin bzw. auf das Tyrosinanion zurückgehen (bei Betrachtung der proteinspezifischen Absorption), ist es ausgeschlossen, daß sie durch eine stärkere Lichtstreuung entstehen.

4 Die Identifizierung kupferbindender Histidine

Bei der Photooxidation des *Eurypelma-californicum*-Hämocyanins ohne Zusatz eines Photosensibilisators werden nur einige der Histidinreste zerstört (bei der Bestrahlung von 37 S-Hc 31 %, siehe S. 75). Die Wirkung der Bestrahlung ist aber nicht auf die Oxidation weniger Histidinreste des Proteins beschränkt, sie führt vielmehr auch zu einer irreversiblen Denaturierung des Proteins. Diese Denaturierung wurde sowohl bei der Bestrahlung von einzelnen Untereinheiten, von Untereinheiten-Gemischen und von 37 S-Hämocyanin beobachtet. Methodisch ist es unbedeutend, ob bei der Bestrahlung zwischen der Lichtquelle und der Proteinlösung zusätzlich ein Schutzfilter (eine 10 %ige wäßrige Acetonlösung) eingeschaltet wird oder nicht: mit Filtern verlängern sich nur die zur Erzielung gleicher Ergebnisse notwendigen Bestrahlungszeiten. Die bei der Photooxidation gemessene Freisetzung des im aktiven Zentrum gebundenen Kupfers - der Kupfergehalt bestrahlter Hämocyaninproben sank von 100 % auf unter 5 % - kann daher sowohl eine Folge der Oxidation kupferkomplexierenden Histidinreste, als auch die einer allgemeinen Denaturierung des Proteins sein. Die durch die Sequenzanalyse von photooxidiertem Hämocyanin erfolgte Identifizierung eines photolabilen Histidinrestes im "His/Trp-reichen Peptid" ist ein Beweis, daß dieses Peptid in unmittelbarer Nähe zu einem Singulett-Sauerstoff-Bildungsort liegt.

5 Das aktive Zentrum des Arthropoden-Hämocyanins - eine Hypothese

Nachdem unabhängig voneinander drei Arbeitsgruppen die außergewöhnliche Aminosäuresequenz

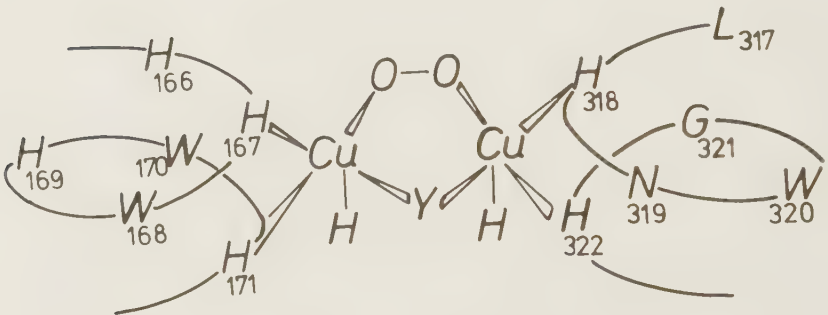


im Hämocyanin dreier Arthropodenarten fanden, wurde die Beteiligung dieses Sequenzabschnittes am Aufbau des aktiven Zentrums diskutiert (SCHNEIDER et al., 1982; YOKOTA et al., 1983), wobei die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen zur Aufklärung der Struktur und Funktion des aktiven Zentrums (SOLOMON, 1982, Review; Abb. 4) berücksichtigt wurden. Die Röntgenstrukturanalyse von *Panulirus interruptus* Hämocyanin mit einer 4 Å-Auflösung (GAYKEMA et al., 1983) zeigte, daß die beiden Kupferatome von helicalen Bereichen der Polypeptidkette "eingerahmt" werden. In Abb. 58 wird ein Modell des aktiven Zentrums vorgeschlagen, das die Lokalisation von vier der sechs möglichen kupferbindenden Histidine in der Primärstruktur zweier Untereinheiten des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* beinhaltet. Kernpunkt ist die Annahme, daß zwei sich gegenüberliegende helicale Bereiche der Polypeptidkette jeweils ein Kupferatom über zwei Histidinreste komplexieren. Hierzu sind Sequenzabschnitte, bei denen zwei Histidinreste durch drei Aminosäuren voneinander getrennt liegen, besonders gut geeignet: bei einer - His - X - X - X - His -Anordnung stehen (eine α -helicale Struktur vorausgesetzt) die beiden Imidazolringe der Histidinreste (leicht versetzt) in gleicher Richtung (PAULING et al., 1951). Die Modifikation eines der Histidinreste des "His/Trp-reichen Peptids" durch Photooxidation unterstützt die Annahme, daß dieser Sequenzabschnitt direkt am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt ist. Für den zweiten helicalen Bereich zur Kupferbindung bietet sich der Sequenzabschnitt



an, der für die Untereinheit a, d, e von *Eurypelma*- und der Kette α von *Tachypleus*-Hämocyanin identisch ist.

Abb. 58: Modell des aktiven Zentrums von oxygeniertem Arthropoden-Hämocyanin; die Numerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Primärstruktur der Untereinheit e von *Eurypelma californicum*-Hc (SCHNEIDER et al., 1983). Die Positionen der beiden weiteren geforderten Histidinreste (Abb. 4, S. 7) in der Primärstruktur sind noch ungeklärt, ebenso ist eine Zuordnung des Tyrosins Y zur Primärstruktur noch nicht möglich.



Die Bildung des aktiven Zentrums durch diese beiden Sequenzabschnitte führt zu einer Anhäufung von Tryptophanresten in direkter chemischer Umgebung der Sauerstoffbindungsstelle. Dieses ist im Einklang mit den Befunden von BANNISTER und WOOD (1971) und von LOEWE (1978): die tryptophanabhängige Fluoreszenz ist eindeutig mit dem Grad der Sauerstoffbeladung des Hämocyanins korreliert.

E ZUSAMMENFASSUNG

1 Isolierung der Untereinheit f

Die Untereinheit f des Hämocyanins der Vogelspinne *Euryelma californicum* wird aus dem Dimerengemisch des 37 S-Dissoziats über Ionenaustauschchromatographie präparativ isoliert; Verunreinigungen dieses Proteins durch weitere Untereinheiten sind in der SDS-PAGE bzw. der zweidimensionalen Immunelektrophorese nicht nachweisbar.

Bei der Isolierung der Untereinheit f fällt die Untereinheit b als Homodimer b_2 an.

Untereinheit c wird durch Ionenaustauschchromatographie des b/c-Gemisches unter Zusatz von 4 M Harnstoff isoliert.

Bei der Chromatofokussierung des Monomerengemisches wird Untereinheit g analytisch rein isoliert.

Die Dissoziation des 37 S-Moleküls und die Isolierung der Untereinheiten haben nur bei den Untereinheiten b und c eine Beeinträchtigung der Sauerstoffbindungsfähigkeit und einen beträchtlichen Kupferverlust zur Folge.

2 Proteinchemische Charakterisierung der Untereinheit f

Die N-terminale Sequenz der Untereinheit f lautet
Thr - Val - Pro - Asp - .

Die Spaltung der Kette f mit Bromcyan und die limitierte Proteolyse der Untereinheit f mit Trypsin bzw. mit der *Staphylococcus-aureus*-Protease ermöglichen die Isolierung größerer Spaltprodukte.

Die Bromcyanspaltung der Kette f ist nicht quantitativ: 20 % der Methionine werden nicht modifiziert.

11 BrCN-Peptide mit Molekulargewichten zwischen 21.600 und 2.000 wurden durch Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie

matographie und/oder reversed-phase HPLC isoliert und charakterisiert.

3 Untersuchungen zur Kupfer-Protein-Wechselwirkung

Hämocyanin wird durch kurzfristige Inkubation mit Cyanid quantitativ in apo-Hc übergeführt. Das UV-Spektrum des apo-Hämocyanins unterscheidet sich im proteinspezifischen Absorptionsbereich von dem Spektrum der oxygenierten Kontrollprobe: die Absorption bei 250 nm ist bei apo-Hc stark erhöht.

Die Photooxidation oxygenierter Hc-Lösungen ohne Zusatz eines Photosensibilisators führt zum Abbau von 31 % der vorliegenden Histidinreste, zu einem vollständigen Verlust der Sauerstoffbindungsfähigkeit und zu einer starken Abnahme des Kupfergehaltes des Hämocyanins.

Die tryptischen Peptide der photooxidierten Untereinheit a wurden über Gelchromatographie und reversed-phase HPLC isoliert. Einige der sequenzierten Peptide zeigen sehr starke Homologien zu bekannten Sequenzen anderer Arthropoden-Hämocyanine.

Die Photooxidation der Untereinheit a führt zu einer bevorzugten Zerstörung des 2. Histidinrestes des "His/Trp-reichen Peptids".

F LITERATURVERZEICHNIS

- AMBLER, R. P. (1965). The behaviour of peptides formed by cyanogen bromide cleavage of proteins. *Biochem. J.* 96, 32.
- BANNISTER, J. V. (ed) (1977). *Structure and Function of Haemocyanin*. Springer-Verlag, Berlin.
- BATES, D.L., PERHAM, R. N. & COGGINS, J. R. (1975). Methods for obtaining peptide maps of proteins on a subnanomole scale. *Anal. Biochem.* 68, 175 - 184.
- BIJLHOLT, M. M. C., VAN BRUGGEN, E. F. J. & BONAVENTURA, J. (1979). Dissociation and reassembly of *Cimulus polyphemus* hemocyanin. *Eur. J. Biochem.* 95, 399 - 405.
- BRAMHALL, S., NOACK, N., WU, M. & LOEWENBURG, J.R. (1969). A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 31, 146 - 148.
- BRAUNITZER, G. & ASCHAUER, H.-J. (1975). Über die Spaltung von Eiweißstoffen mit Bromcyan. *Hoppel-Seyler's Physiol. Chem.* 356, 473 - 474.
- BROWN, J. M., POWERS, L., KINCAID, B., LARRABEE, J.A. & SPIRO, T. G. (1980). Structural Studies of the Haemocyanin Active Site. 1. Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4210 - 4216.
- BUSSELEN, P. (1970). The electrophoretic heterogeneity of *Carcinus maenas* hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 415 - 420.
- CANFIELD, R. E. (1963). Peptides derived from tryptic digestion of egg white Lysozyme. *J. Biol. Chem.* 238, 2691 - 2697.
- CHANG, J. Y., BRAUER, D. & WITTMANN-LIEBOLD, B. (1978). Microsequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Letters* 93, 205 - 214.
- CRESTFIELD, A. M., MOORE, S., STEIN, W. H. (1963). The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622 - 627.
- DECKER, H. (1981). Über die Quartärstruktur des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Dissertation, München.
- DE LEY, M. & LONTIE, R. (1972). The reversible reaction of cyanid with *Helix pomatia* haemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta*, 278, 404 - 407.

- DE LEY, M. & LONTIE, R. (1977). The photooxidation of Helix pomatia Haemocyanin. In: Lamy, J. & Lamy, J. (eds.) (1981). Invertebrate Oxygen Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function. Marcel Dekker, New York.
- EDMAN, P. & HENSCHEN, A. (1975). In: Protein Sequence determination (ed. Needleman, S. B.), 232 - 279. Springer-Verlag, Berlin.
- ELIAS, H.-G. (1969). Ultrazentrifugen - Methoden. Beckman Instruments GmbH, München.
- ENGELBORGH, V., WITTERS, R. & LONTIE, R. (1968). Photooxidation of Helix pomatia haemocyanin. Arch. Intern. Physiol. Biochim. 76, 373 - 373.
- FELIX, A. M. & JIMENEZ, M. H. (1974). Usage of fluorescamine as a spray reagent for thinlayer chromatography. J. Chromatogr. 89, 361 - 364.
- FELSENFIELD, G. (1954). The binding of Copper by hemocyanin. J. Cell. Comp. Physiol. 43, 23 - 38.
- FOOTE, C. S. (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation. Science, 162, 963.
- FORMAN, H. J., EVANS, H. J., HILL, R. L. & FRIDOVICH, J. (1973). Histidine at the Active Site of Superoxide Dismutase. Biochemistry 12, 823 - 827.
- FREDERICQ, M. L. (1878). Sur l'hémocyanine, substance nouvelle du sang de Poulpe (Octopus vulgaris). C. r. hebdomadaire. Séances. Acad. Sci. Paris 87, 996 - 998.
- GAYKEMA, W. P. J., VAN SCHAICK, E. J. M., SCHUTTER, W. G. & HOL, W. G. J. (1983). Crystal Structure of Panulirus interruptus Hemocyanin. Preliminary Results at 4 Å Resolution. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982 (ed. E. J. Wood). Harwood academic publishers, Chur, London, New York.
- GHIRETTI, F. ed. (1968). Physiology and biochemistry of hemocyanins. Academic press, London and New York.
- GROSS, E. & WITKOP, B. (1962). Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. J. Biol. Chem. 237, 1856 - 1860.
- HIMMELWRIGHT, R. S., EICKMAN, N. C. & SOLOMON, E. J. (1979). Comparison of Half-Met and Met-Apo Hemocyanin. Ligand Bridging at the Binuclear Coppel Active Site. J. Am. Chem. Soc. 101, 1576 - 1586.

- JORI, G., GALIAZZO, G., MARCHIORI, F. & SCOFFONE, E. (1970).
Int. J. Protein Res. 2, 247 - 256.
- JORI, G., TAMBURRO, A. M. & AZZI, A. (1974). Photochem. Photo-
biol. 19, 337 - 345.
- KATZ, A. M., DREYER, W. J. & ANFINSEN, C. B. (1959). Peptide
separation by two-dimensional chromatography and electro-
phoresis. J. Biol. Chem. 234, 2897 - 2900.
- KEMPTER, B. (1983) Dissertation, München.
- KOLB, E., HARRIS, J. I. & BRIDGEN, J. (1974). Biochem. J. 137,
185 - 197.
- KOBERT, R. (1903). Über Hämocyanin nebst einigen Notizen über
Hämerythrin. Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 98, 411 - 427.
- KRATZIN, H., YANG, C., KRUSCHE, J. U. & HILSCHMANN, N. (1980).
Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysats eines
Proteins mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie.
Die Primärstruktur einer monoklonalen L-Kette vom K-Typ,
Subgruppe I. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1591 -
1598.
- KUBOWITZ, F. (1938). Spaltung und Resynthese der Polyphenol-
oxydase und des Hämocyanins. Biochem. Z. 299, 32 - 57.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during
the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (London)
227, 680 - 685.
- LAMY, J., LAMY, J., BAGLIN, M. C. & WEILL, J. (1977). Scorpion
hemocyanin subunits: properties dissociation, association.
In: Structure and Function of Hemocyanin (ed. J. V.
Bannister). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- LAMY, J., LAMY, J., WEILL, J., MARKL, J., SCHNEIDER, H.-J. &
LINZEN, B. (1979). Hemocyanins in spiders. VII. Immunological
comparison of the subunits of Eurypelma californicum hemo-
cyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 889 - 895.
- LAMY, J. & LAMY J. (1981). Invertebrate Oxygen Binding Proteins:
Structure, Active Site, and Function. Marcel Dekker,
New York.
- LERCH, K. (1978). Amino acid sequence of tyrosinase from Neuro-
spora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3635 - 3639.
- LINZEN, B. (1983). Subunit Heterogeneity in Arthropodan Hemo-
cyanins. In "Structure and Function of Invertebrate Respira-
tory Proteins - EMBO Workshop 1982 (ed. E. J. Wood)".
Harwood academic press, Chur, London, New York.

- LOEWE, R. und LINZEN, B. (1973). Hemocyanins in spiders. I. Subunits and stability region of *Dugesia californica* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 182 - 188.
- LOEWE, R. (1978). Hemocyanins in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. J. Comp. Physiol. 128, 161 - 168.
- LONTIE, R. (1958). The Binding of Copper in Hemocyanins. Clin. Chim. Acta 3, 68 - 71.
- LONTIE, R., BLATON, V., ALBERT, M. & PEETERS, B. (1965). Reconstitution of *Helix pomatia* hemocyanin with the copper (I) acetonitrile complex. Arch. J. Physiol. Bioch. 73, 150 - 152.
- LONTIE, R. & WITTERS, R. (1973). Hemocyanin. In "Inorganic Biochemistry" (ed. G. L. Eichorn). 344 - 358. Elsevier, Amsterdam.
- LOTTSPEICH, F. (1980). Identification of the phenylthiohydantoin derivatives of amino acids by high pressure liquid chromatography, using a ternary, isocratic system. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829 - 1834.
- MANGUM, C. P. (1980). Respiratory function of the hemocyanins. Am. Zool. 20, 19 - 38.
- MARKL, J. (1976). Das Hämocyanin dreier Spinnenarten. Isolierung und chemische Charakterisierung. Dissertation, München.
- MARKL, J., MARKL, A., SCHARTAU, W. & LINZEN, B. (1979a). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. I. Chelicerata. Comp. Physiol. 130, 283 - 292.
- MARKL, J., HOFER, A., BAUER, G., MARKL, A., KEMPTER, B., BRENNZINGER, M. & LINZEN, B. (1979b). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. II. Crustacea. J. Comp. Physiol. 133, 167 - 175.
- MARKL, J., SAVEL, A., DECKER, H. & LINZEN, B. (1980). Hemocyanins in spiders. IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 649 - 660.
- MARKL, J. & KEMPTER, B. (1981). Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immunoelectrophoresis. J. Comp. Physiol. 141, 495 - 502.
- MARKL, J., DECKER, H., STÖCKER, W., SAVEL, A., LINZEN, B., SCHUTTER, W.G. & VAN BRUGGEN, E. F. J. (1981). On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 185 - 188.

- MARKL, J., DECKER, H., SAVEL, A. & LINZEN, B. (1981). Homogeneity subunit heterogeneity, and quaternary structure of Eurypelma hemocyanin. In: Structure, active site, and function of invertebrate oxygen binding proteins. (eds. Lamy, J. & Lamy, J.), Dekker, New York.
- MATSUBARA, H. & SASAKI, R. M. (1969). Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175 - 181.
- MAURER, H. R. (1968). Disc-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- MURRAY, A. C. & JEFFREY, P. D. (1974). Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish Cherax destructor. Subunit heterogeneity. Biochemistry 12, 2444 - 2449.
- NARITA, K. & TITANI, K. (1968). J. Biochem. 63, 226 - 241.
- NEMOTO, T. & TAKAGI, T. (1983). Primary Structure of Tachyplesus tridentatus Hemocyanin α Chain. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982 (ed. E. J. Wood). Harwood academic press, Chur, London, New York.
- PAULING, L., COREY, R. B., BRANSON, H. R. (1951). The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37, 205 - 211.
- PENKE, B., FERENCZI, R. & KOVACS, K. (1974). A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. Anal. Biochem. 60, 45 - 50.
- REDFIELD, A. C. (1934). The haemocyanins. Biol. Rev. 9, 175 - 212.
- SCHARTAU, W., EYERLE, F., REISINGER, P., GEISERT, H. (1983a). Sequence studies on chain d of Eurypelma hemocyanin and comparison with chain e. In "Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982 (ed. E. J. Wood). Harwood academic press, Chur, London, New York.
- SCHARTAU, W., EYERLE, F., REISINGER, P., GEISERT, H., STORZ, H., LINZEN, B. (1983b). Hemocyanins in spiders XIX: Complete amino-acid sequence of subunit d from Eurypelma californicum hemocyanin, and comparison to chain e. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1383 - 1409.
- SCHNEIDER, H.-J., MARKL, J., SCHARTAU, W. & LINZEN, B. (1977). Hemocyanins in spiders. IV. Subunit heterogeneity of Eurypelma (Dugesia) hemocyanin and separation of polypeptide chains. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1133 - 1141.
- SCHNEIDER, H.-J. (1978). Über die Heterogenität der Untereinheiten des Hämocyanins aus der Vogelspinne Eurypelma californicum. Dissertation, München.

- SCHNEIDER, H.-J., SCHARTAU, W., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1980). Hemocyanins in spiders. X. Limited proteolysis of chain e of Eurypelma hemocyanin and partial sequence of two large fragments. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1211 - 1216.
- SCHNEIDER, H.-J., ILLIG, U., MÜLLER, E., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1982). Hemocyanins in spiders. XVII. A presumptive active-site sequence of arthropodan hemocyanins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 487 - 492.
- SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., FELDMAIER, G., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F., HENSCHEN, A. (1983). Hemocyanins in spiders XVIII: Complete amino-acid sequence of subunit e from Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1357 - 1381.
- SCHROEDER, W. A., SHELTON, J. B. & SHELTON, J. R. (1969). Arch. Biochem. Biophys. 130, 551 - 556.
- SOLOMON, E. J. (1981). Binuclear Copper Active Site. In: Copper Proteins (ed. T. G. Spiro), Academic Press, New York.
- STRYCH, W. (1981). Proteinchemischer Vergleich der Hämocyanin-untereinheiten aus der Spinne Eurypelma californicum und Cupiennius salei. Dissertation, München 1981.
- TALLANDINI, L., SALVAO, B. & JORI, G. (1975). Photochemical effects associated with the copper absorption bands of the native hemocyanin from octopus vulgaris. FEBS Letters, 54, 283 - 285.
- TOMITA, M., IRIE, M. & UKITA, T. (1969). Sensitized photooxidation of Histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction. Biochemistry, 8, 5149 - 5160.
- VAN HOLDE, K. E. & VAN BRUGGEN, E. F. J. (1971). The Hemocyanins. In: Biological Macromolecules, Vol. 5, pt. A (ed. S. N. Timasheff & G. D. Fasman), 1 - 55. Marcel Dekker, New York.
- VAN HOLDE, K. E. & MILLER, K. J. (1982). Haemocyanins. Quarterly Rev. Biophys. 15, 1 - 129.
- VAN HOLDE, K. E. (1983). Some unresolved problems concerning hemocyanins. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982 (ed. E. J. Wood), 403 - 412. Harwood academic publishers, Chur, London, New York.
- WALSH, K. A., ERICSSON, L. H., PARMELEE, D. C. & TITANI, K. (1981). Advances in Protein Sequencing. Ann. Rev. Biochem. 50, 161 - 284.

- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406 - 4412.
- WEEKE, B. (1973). In: A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications (eds. N. H. Axelsen, J. Kroll & B. Weeke), 44 - 56, Blackwell, Oxford.
- WOOD, E. J. & BANNISTER, W. H. (1967). Photooxidation of haemocyanin in the presence of methylene blue. *Biochem. J.* 104, 42.
- WOOD, E. J. & BANNISTER, W. H. (1968). The effect of photooxidation and Histidine reagents on Murex trunculus haemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta*, 154, 10 - 16.
- WOOD, E. J., ed. (1983). Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982. Life Chemistry Reports, Supplement 1. Harwood academic publishers, Chur, London, New York.
- YOKOTA, E., MOORE, M. D., BEHREN, P. Q. & RIGGS, A. F. (1983). Structural studies of Hemocyanin II from *Limulus polyphemus*: a review of progress and prospects. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins. - EMBO Workshop 1982. (ed. E. J. Wood). Harwood academic publishers, Chur, London, New York.
- ZOLLA, L., AIROLDI, L., KUIPER, A., COSTANTINI, S. & BRUNORI, M. (1983). Copper removal from hemocyanins by cyanide in presence of absence of gaseous ligands. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982 (ed. J. E. Wood). Harwood academic publishers, Chur, London, New York.

LEBENS LAUF

Vor- und Familienname: Peter Nahke
Geburtstag und -ort: 9. April 1949, Hamburg
Eltern: Kurt Nahke und Inge Nahke, geb. Tauchert

1956 - 1960 Besuch der Volksschule in Hamburg
1960 - 1961 Besuch des Gymnasiums Uhlenhorst-Barmbek
(math.-naturwissensch.) in Hamburg
1961 - 1969 Besuch des Luitpold-Gymnasiums (math.-
naturwissensch.) in München
Juni 1969 Abitur

Okt. 1969 - Dez. 1969 Chemiestudium an der Universität München
Jan. 1970 - Juni 1971 Ableistung des Ersatzdienstes im Nerven-
krankenhaus Haar bei München
Nov. 1971 - April 1977 Chemiestudium an der Universität München
Mai 1977 - Aug. 1978 Diplomarbeit unter Anleitung von
Prof. Dr. E. L. Winnacker am Biochemischen
Institut der Universität München
April 1979 - April 1983 Doktorarbeit unter Anleitung von
Prof. Dr. B. Linzen am Zoologischen
Institut der Universität München

ab Juni 1983 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im
Institut für Biochemie und Technologie
der Bundesforschungsanstalt für Fischerei
in Hamburg

